

LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PRODUITS DE STOCKAGE
IN VITRO PAR LE MARQUAGE DES FIBROBLASTES AVEC
DES PRECURSEURS RADIOACTIFS DES MUCOPOLYSACCHARIDES

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention sciences biologiques

par

Jean-François CONSCIENCE

de

Genève et Delémont (BE)

Thèse No 1635

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

Section de Biologie

Département de Biologie moléculaire

Professeur R.H. Epstein

LES MUCOPOLYSACCHARIDOSES

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES PRODUITS DE STOCKAGE
IN VITRO PAR LE MARQUAGE DES FIBROBLASTES AVEC
DES PRECURSEURS RADIOACTIFS DES MUCOPOLYSACCHARIDES

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention sciences biologiques

par

Jean-François CONSCIENCE

de

Genève et Delémont (BE)

Thèse No 1635

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur
R.H. EPSTEIN, Département de Biologie moléculaire,
directeur de thèse, et d'une commission composée de
Messieurs U. WIESMANN (Kinderklinik - Berne) et J.
DESHUSSES (Faculté des Sciences - Genève), autorise
l'impression de la présente thèse, sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 6 décembre 1973

Le Doyen :

Thèse no 1635

Jean MULLER



Le travail de recherche a été présenté devant la Faculté des Sciences de l'Université de Genève en automne 1973 pour remplir, en partie, les conditions posées à l'obtention du doctorat-ès-Sciences.

C'est un plaisir que de m'acquitter ici d'une dette de reconnaissance envers le professeur W. Schmid, directeur du département de Génétique médicale au Kinderspital de Zürich. En m'offrant la généreuse possibilité de travailler comme assistant dans son laboratoire, il m'a permis tout d'abord de me familiariser avec les techniques de la culture de tissus et les problèmes actuels de la Génétique médicale, de la Cytogénétique et du diagnostic prénatal. Ensuite, il a rendu possible cette étude par son large soutien financier, son intérêt constant et ses encouragements, ainsi qu'en me donnant la possibilité de rencontrer des chercheurs d'autres laboratoires lors de congrès et de stages. Enfin, il m'a aidé de ses précieux conseils dans la conduite des expériences et dans la rédaction de cette thèse. A lui d'abord, je tiens à adresser ici mes plus vifs remerciements.

Je remercie également mon directeur de thèse, le professeur R.H. Epstein du Département de Biologie moléculaire de l'Université de Genève, de son intérêt et de ses critiques judicieuses, ainsi que le Dr. U. Wiesmann (Kinderklinik, Berne) qui a vérifié le phénotype biochimique de mes lignées mutantes et a lu avec un sens critique aigu les premières versions de cette thèse.

Ces recherches n'ont été possibles que grâce aux nombreuses lignées de cellules mutantes dont j'ai pu disposer. Je remercie ici tous les médecins qui m'ont fait parvenir des biopsies cutanées ou des lignées fibroblastiques établies dérivées de patients diagnostiqués dans leurs services, en particulier, le professeur P. Ferrier (Genève)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0021

et les docteurs K. Baerlocher (Saint-Gall), G. Katakaidis (Lausanne), P. Maroteaux (Paris) et S. Rampini (Zürich).

Enfin, j'exprime également ma reconnaissance au professeur R. Gitzelmann (Kinderspital Zürich) pour avoir mis à ma disposition les instruments nécessaires aux déterminations biochimiques et à Mme M. Nater pour son aide experte dans la culture de tissus.

TABLE DES MATIERES

<u>RESUME</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	2
1. Les mucopolysaccharidoses	3
2. Etudes biochimiques in vitro	4
3. Nature des produits de stockage in vitro	7
4. Structure chimique des mucopolysaccharides	9
5. Aspects théoriques de la technique de marquage	10
6. Efficacité et sélectivité de la technique de marquage	13
7. Marquage des lignées de mucopolysaccharidoses	14
<u>MATERIEL ET TECHNIQUES</u>	17
<u>ETUDE DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE</u>	25
1. Etudes cinétiques	25
2. Modifications de la technique standard	30
3. Evaluation de la technique standard	34
<u>ETUDE DES LIGNEES DE MUCOPOLYSACCHARIDOSES</u>	38
1. Résultats d'accumulation	38
2. Interprétation et discussion des résultats d'accumulation	41
3. Résultats autoradiographiques	48
<u>CONCLUSION</u>	55
<u>AUTEURS CITES</u>	60
<u>TABLEAUX 1-10</u>	
<u>FIGURES 1-9</u>	
<u>PLANCHES 1-3</u>	

RESUME

Une technique a été mise au point qui permet de marquer avec une sélectivité satisfaisante les différentes espèces de mucopolysaccharides in vitro. Elle se fonde sur l'administration, à des fibroblastes cultivés à partir de biopsies cutanées, de précurseurs radioactifs des mucopolysaccharides (sulfate, glucosamine, galactosamine et galactose) dans des conditions techniques telles que les interconversions métaboliques sont fortement réduites et que la dégradation des produits marqués autres que les mucopolysaccharides est stimulée.

L'application de cette technique à diverses lignées cellulaires dérivées de patients atteints de mucopolysaccharidoses permet de définir, selon le type de la maladie, des augmentations spécifiques et reproductibles de l'incorporation de certains précurseurs, par rapport aux lignées de fibroblastes normaux. L'identité chimique des mucopolysaccharides stockés peut alors être déduite en tenant compte de la structure de ces macromolécules.

Dans les limites de sensibilité de cette technique, on démontre:

- 1) un stockage d'héparan sulfate dans les lignées de Hurler, Hunter, Sanfilippo A et Maroteaux-Lamy.
- 2) une absence de stockage d'héparan sulfate dans les lignées de Sanfilippo B.
- 3) un stockage de dermatan sulfate dans deux lignées de Hunter, une lignée de Sanfilippo B et une lignée de Maroteaux-Lamy.
- 4) une absence de stockage de dermatan sulfate dans une lignée de Hunter et dans les lignées de Sanfilippo A.

En outre, la détection de l'incorporation du sulfate radioactif peut se faire avec sûreté par autoradiographie, sur de très faibles quantités de cellules. Cette modification analytique peut donc être proposée comme méthode de détection prénatale des mucopolysaccharidoses dans des délais compatibles avec les impératifs gynécologiques inhérents au diagnostic in utero.

INTRODUCTION

Les mucopolysaccharidoses ont suscité, ces dernières années, un intérêt considérable dans les milieux scientifiques et médicaux, en particulier depuis que l'expression phénotypique de ces mutations a été démontrée in vitro, sur des lignées de fibroblastes cutanés développées à partir de patients. Les biochimistes ont vu là une occasion excellente d'étudier relativement facilement les processus normaux de dégradation des mucopolysaccharides et de leurs protéoglycans*, qui avaient échappé jusqu'alors à toute description précise, puisque ces mutations affectent précisément le catabolisme de ces macromolécules. Les médecins cherchent à appliquer les données biochimiques récentes au développement de méthodes sûres et pratiques de diagnostic, tant pour les patients supposés que pour la détection prénatale, dans des délais raisonnables, de ces défauts du métabolisme. Tous ces espoirs sont en bonne voie de se réaliser.

En relation avec les données biochimiques nouvelles, il nous a paru intéressant de chercher à caractériser les produits de stockage qui s'accumulent en culture de tissus à la suite du défaut primaire. Pour éviter d'avoir recours aux méthodes traditionnelles chimiques de séparation et d'identification des mucopolysaccharides qui ne présentent pas, avec les faibles quantités de matériel disponibles in vitro, toute la sûreté désirable, nous avons développé une technique indirecte reposant sur le marquage radioactif des mucopolysaccharides à l'aide de précurseurs spécifiques marqués. Nous décrivons, dans ce rapport, la technique proprement dite, ses qualités et ses défauts, les résultats d'accumulation observés dans quelques lignées de mucopolysaccharidoses et, enfin, l'intérêt potentiel de notre méthode pour la détection prénatale de ces maladies.

* Nous avons adopté la nomenclature de Jeanloz (1960) pour les noms des mucopolysaccharides individuels. Par contre, nous avons préféré ce dernier terme à celui de glycosylaminoglycuroglycan pour désigner les chaînes polysaccharidiques libres. Protéoglycan est utilisé pour les complexes mucopolysaccharides-protéines.

Nous résumerons dans cette introduction l'essentiel de nos connaissances récentes des mucopolysaccharidoses, en nous attachant surtout aux propriétés biochimiques de ces mutants et aux études in vitro. Puis, un examen rapide des principales caractéristiques structurales des mucopolysaccharides nous permettra de présenter notre méthode, ses fondements théoriques, son élaboration et les données, issues de la bibliographie, qui, conjointement avec nos propres essais techniques, nous fournissent une évaluation de sa spécificité et de sa sensibilité.

1. Les mucopolysaccharidoses

On désigne sous le nom général de mucopolysaccharidoses un certain nombre d'entités morbides héréditaires présentant des manifestations cliniques et pathologiques variées, mais toutes caractérisées par une accumulation intratissulaire de mucopolysaccharides sulfatés.

Depuis les observations originales (Hunter, 1917; Hurler, 1919), de nombreux cas ont été décrits. Ils démontrent une grande hétérogénéité clinique et pathologique de ces maladies. Ce n'est pas le lieu de discuter ici en détail des critères cliniques, pathologiques, génétiques et chimiques qui ont conduit McKusick et al. (1965) à proposer une classification de ces entités qui est maintenant assez généralement adoptée par les milieux médicaux et que nous suivrons dans ce travail. Nous nous bornons à indiquer dans le tableau 1 les principales données en les groupant selon les divers niveaux de connaissance des maladies génétiques qu'O'Brien (1969) définit. Il va sans dire que le niveau d'altération génétique primaire (nature de la lésion sur le DNA) est encore dans tous les cas inconnu. Le lecteur cliniquement intéressé trouvera parmi les références qui suivent les détails qu'il souhaite:

Revue générale:	Maroteaux et Lamy (1965); McKusick et al. (1965); Kaplan (1969); Spranger (1970); Spranger (1972).
Revue spécialisée:	<u>Hurler et Hunter</u> : Meyer et Hofman (1961); Dorfman et Matalon (1969).

Sanfilippo: Spranger et al. (1967);
Rampini (1969).

Morquio: Goidanich et Lenzi (1964);
Dodion et al. (1969).

Scheie: Rampini (1969).

Maroteaux-Lamy: Spranger et al. (1970).

Observations princeps: Hunter (1917); Hurler (1919); Morquio
(1929); Sanfilippo et al. (1962); Scheie
et al. (1962); Maroteaux et al. (1963).

Il est intéressant de noter, sur le tableau 1, que le groupement de ces différents syndromes en un certain nombre de types biochimique, génétique ou clinique dépend largement des critères que l'on considère. En outre, cette classification ne saurait nous faire oublier que des cas nouveaux, plus ou moins bien définissables, restent un problème que rencontre encore fréquemment le clinicien (Langer et al., 1966; Thompson et al., 1968; McKusick, 1969; Philippart et Sugarman, 1969; Winchester et al., 1969; Horton et Schimke, 1970; Schuster et Spranger, 1971; Spranger et al., 1971; Sly et al., 1973). Les travaux récents décrits ci-dessous permettent certes d'interpréter certains de ces cas en termes de polyallélisme ou de composés génétiques (McKusick et al., 1972), mais c'est un fait que nos connaissances actuelles n'expliquent ni ne décrivent l'ensemble des possibilités d'hétérogénéité constatées ou théoriquement supposées.

2. Etudes biochimiques in vitro

C'est de loin l'étude des mucopolysaccharidoses en culture de tissus qui a le plus contribué, ces dernières années, à enrichir notre connaissance des fondements biochimiques de ces maladies. La démonstration par Danes et Bearn (1965) d'une métachromasie positive au bleu de toluidine dans les lignées fibroblastiques dérivées de patients homozygotes est à l'origine d'un grand nombre de travaux originaux in vitro, en dépit du fait que la méthode histochimique initialement utilisée, malgré certains perfectionnements récents (Danes et al., 1970), ne présente pas toutes les garanties de spécificité

souhaitées (Milunsky et Littlefield, 1969; Taysi et al., 1969).

L'étude cinétique de l'incorporation du sulfate radio-actif a permis de caractériser de façon spécifique, in vitro, l'accumulation anormale de mucopolysaccharides et de prouver qu'un défaut de dégradation de ces macromolécules est bien à l'origine de ce stockage excessif, la synthèse et la sécrétion restant par ailleurs parfaitement normales (Fratantoni et al., 1968). Dans les cultures mixtes, combinant des cellules issues de deux patients différents, l'incorporation du sulfate redevient normale, si ces patients appartiennent à deux types biochimiques distincts. Cette correction métabolique repose sur l'échange intercellulaire de facteurs spécifiques que les cellules libèrent dans le milieu de culture (Fratantoni et al., 1968; Neufeld et Cantz, 1971). La détermination systématique des possibilités correctives d'un grand nombre de lignées mutantes a permis de définir divers groupes de patients dont les fibroblastes présentent une déficience du même facteur et qui, partant, ne se corrigent pas en culture mixte. Ces groupes correctifs sont indiqués dans le tableau 1. Souvent, ils correspondent à des entités cliniques précédemment différenciées, mais ceci n'est pas la règle. Les malades atteints du syndrome de Sanfilippo, quoique cliniquement identiques, se divisent en deux groupes mutuellement correctibles qui définissent les types A et B de cette maladie (Kresse et al., 1971). Inversément, les patients atteints des deux entités cliniquement différentes de Scheie et de Hurler donnent des lignées de fibroblastes qui ne se corrigent pas in vitro (Wiesmann et Neufeld, 1970). Ces deux faits conduisent à l'hypothèse que deux mutations sur deux lieux génétiques distincts aboutissent au même tableau clinique dans le cas du syndrome de Sanfilippo, alors que deux mutations, probablement alléliques, sur le même lieu sont responsables de deux entités cliniques différentes, les syndromes de Hurler et de Scheie. Nous verrons que les résultats les plus récents confirment pleinement cette hypothèse. Actuellement, l'étude d'une lignée inconnue en culture mixte reste le meilleur critère pour confirmer ou déterminer aisément son type biochimique, en observant ses propriétés correctives

vis-à-vis de souches de référence.

Les facteurs correctifs présents dans le milieu de culture se trouvent également dans l'urine normale, qui constitue ainsi une source abondante de matériel de départ en vue de leur purification et de leur caractérisation (Neufeld et Cantz, 1971). De cette façon, quatre d'entre eux ont déjà pu être associés avec une activité enzymatique précise. Les facteurs qui corrigent les cellules issues de patients atteints des syndromes de Hurler ou de Scheie sont identiques, en accord avec les évidences indirectes de correction. Il s'agit d'une α -L-iduronidase (Matalon et al., 1972; Bach et al., 1972). Le facteur qui corrige les cellules du type Sanfilippo A est une héparan sulfate sulfatase (Kresse et Neufeld, 1972). Il est distinct du facteur corrigeant les cellules du type Sanfilippo B, qui présente, lui, une activité de N-acétyl- α -D-glucosaminidase (O'Brien, 1972; Von Figura et Kresse, 1972). Enfin, le facteur absent des lignées fibroblastiques issues des patients atteints du syndrome de Hunter est une sulfatase spécifique de certains groupes sulfates liés à des résidus disulfatés convenablement localisés, probablement des acides uroniques terminaux (Bach G., Cantz M., Okada S., Neufeld E.F., Fed. Proc., 32, 483, 1973). Les syndromes en question se laissent par conséquent expliquer par un défaut d'activité de l'enzyme correspondante conduisant, de façon compatible avec la structure des mucopolysaccharides, aux caractéristiques d'accumulation résumées sur le tableau 1. Ces enzymes sont des hydrolases lysosomiales. Ainsi se trouve confirmée l'hypothèse de VanHoof et Hers (1964) qui, sur la base d'images au microscope électronique, avaient suggéré que le défaut primaire des mucopolysaccharidoses réside en une absence d'activités enzymatiques spécifiques qui freine la dégradation intralysosomiale des produits de stockage.

In vivo également, ce "turn-over" ralenti des mucopoly-

saccharides sulfatés a été démontré par l'étude de l'excrétion urinaire au cours du temps du ^{35}S -sulfate libre et des mucopolysaccharides marqués, chez des patients atteints des syndromes de Hurler et de Sanfilippo (Bartsocas et Moser, 1970). Aussi peut-on être raisonnablement sûr que le défaut caractérisé dans les systèmes in vitro est bien l'équivalent des phénomènes in vivo.

3. Nature des produits de stockage in vitro

Nous venons de voir la contribution essentielle que la technique d'incorporation du sulfate radioactif et l'étude de la correction métabolique in vitro ont apportée à notre connaissance des mucopolysaccharidoses. Cependant, ces méthodes ne nous apprennent rien sur la nature chimique des produits stockés dans les fibroblastes cultivés, à part qu'il s'agit de molécules sulfatées. Il est évident qu'une simple extrapolation des résultats obtenus in vivo (tableau d'excrétion urinaire, nature des produits de stockage hépatiques, rénaux, cérébraux, etc...) ne saurait avoir ici qu'une valeur vaguement indicative, en raison de la distance considérable, en termes métaboliques, séparant la production de mucopolysaccharides au niveau du fibroblaste et leur excrétion urinaire.

Or, peu de travaux nous renseignent sur la nature des mucopolysaccharides stockés in vitro et leurs conclusions, souvent peu claires, parfois contradictoires, soulignent à la fois la difficulté des études chimiques et le comportement particulier du fibroblaste cultivé.

La plupart des auteurs s'accordent à dire que les fibroblastes normaux, cultivés à partir de diverses sources, produisent surtout de l'acide hyaluronique (Grossfeld et al., 1955; Gaines, 1960; Castor et al., 1962; Hamerman et al., 1965; Danes, 1973), un peu de chondroïtine-sulfate et des traces de dermatan sulfate (Grossfeld et al., 1957). Des études récentes, toutefois, démontrent que l'héparan sulfate est aussi synthétisé en grande quantité, même par des lignées cellulaires qui ont perdu la faculté de produire l'acide

hyaluronique et/ou le chondroïtine-sulfate (Dietrich et DeOca, 1970; Bates et Levene, 1971; Kraemer, 1971). En fait, la synthèse de l'héparan sulfate est une propriété de tant de cellules différentes que d'aucuns n'hésitent pas à affirmer qu'il s'agit là d'une caractéristique cellulaire universelle (Kraemer, 1971).

Sur le plan des lignées mutantes, Matalon et Dorfman (1966 et 1969) trouvent une forte augmentation de dermatan sulfate et un stockage modéré de chondroïtine-sulfate et d'acide hyaluronique dans les cellules de Hurler, Hunter et Sanfilippo. Ils ne détectent par contre ni héparan sulfate, ni kératan sulfate et concluent à l'incapacité des cellules normales aussi bien que mutantes de synthétiser ces produits *in vitro*. Cependant, Schafer et al. (1968) donnent des chiffres pour la production de kératan sulfate tout en confirmant, de même que Herd (1972) et Danes (1973), l'augmentation préférentielle de dermatan sulfate dans les lignées de Hurler. Ainsi, peu de travaux sont disponibles et ils ne nous permettent pas de dégager un tableau de stockage précis *in vitro*.

Il existe par ailleurs un désaccord entre les auteurs pour ce qui concerne l'état moléculaire des produits stockés. Certains (Matalon et Dorfman, 1968) présentent des évidences en faveur de polymères de haut poids moléculaire, alors que d'autres (Fratantoni et al., 1968) décrivent l'accumulation de fragments plus petits, de taille identique à ceux trouvés *in vivo* dans le foie, le rein, l'urine des patients, suggérant par là une dégradation partielle des produits de stockage.

Enfin, aucune étude ne décrit les mucopolysaccharides accumulés *in vitro* dans les syndromes de Maroteaux-Lamy et de Scheie, à l'exception, pour le dernier, de quelques résultats préliminaires de Danes (1973). La maladie de Morquio, quant à elle, semble plutôt être un défaut limité au tissu osseux, puisque les anomalies cliniques résumées sur le tableau 1 sont largement limitées au squelette et que les fibroblastes de peau ne présentent pas l'accumulation de sulfate radioactif caractéristique des autres mucopolysacchari-

doses (Magrini et al., 1967; Wiesmann, communication personnelle).

4. Structure chimique des mucopolysaccharides

La structure chimique des mucopolysaccharides a fait l'objet de nombreux travaux récents qui ont abouti à une bonne description de ces macromolécules et de leur biosynthèse. Notre but n'est pas de décrire ici l'ensemble de ces nouvelles données. Deux revues récentes (Meyer, 1969; Muir, 1969) les résument bien. Nous leur empruntons l'essentiel des renseignements du tableau 2, ainsi que les éléments de l'exposé qui suit.

Il existe trois grandes classes de mucopolysaccharides: les polycarboxylates, porteurs de groupes carboxyliques; les polysulfates, porteurs de groupes sulfates; les polycarboxysulfates, porteurs de groupes carboxyliques et de groupes sulfates. Tous présentent, de ce fait, un caractère nettement acide et une forte solubilité dans l'eau. La plupart sont constitués globalement d'un noyau protéique sur lequel sont greffées des chaînes latérales polysaccharidiques, par l'intermédiaire d'une courte séquence de sucres particuliers. Le nombre, la longueur de ces chaînes et, partant, le poids moléculaire des protéoglycans, ainsi que la présence possible de divers exosubstituants (mannose, acide N-acétyl-neuraminique, pentoses, méthyl-pentoses, etc...) restent autant de questions mal résolues. En fait, ils sont probablement hétérogènes à ces niveaux. L'acide hyaluronique est dépourvu de groupes sulfates. Son association covalente avec une protéine n'est pas encore définitivement prouvée. Sa composition en sucres est identique à celle de l'héparan sulfate, mais l'orientation stéréochimique des liaisons est différente, ce qui entraîne probablement des systèmes d'enzymes distincts pour la dégradation de ces deux macromolécules. Le dermatan sulfate, les chondroïtine-4- et -6-sulfates, ainsi que l'héparan sulfate, sont des protéoglycans sulfatés et carboxylés joints à leur noyau protéique par la même séquence de liaison (acide glucuronique — galactose — galactose — xylose —

seryl). Ils se distinguent par la nature de leurs unités disaccharidiques répétitives dans les chaînes latérales: acide glucuronique ou iduronique et glucosamine N-sulfatée ou N-acétylée pour l'héparan sulfate; acide iduronique ou glucuronique et N-acétyl-galactosamine pour le dermatan sulfate; acide glucuronique et N-acétyl-galactosamine pour les chondroïtine-4- et -6-sulfates. On constate donc que si la nature du sucre aminé est bien déterminée, celle de l'acide uronique l'est moins, les acides iduronique et glucuronique étant, jusqu'à un certain point, interchangeables. En outre, l'héparan sulfate présente une orientation stéréochimique particulière de ses liaisons glycosidiques. Le kératan sulfate se distingue par la nature de sa liaison avec le noyau protéique, variable selon les tissus, et la présence de résidus de galactose en lieu et place d'acide uronique. Enfin, la chondroïtine est simplement l'homologue non sulfaté des chondroïtine-sulfates et, comme pour l'acide hyaluronique, son association covalente avec une protéine n'est pas certaine.

Ainsi, si l'on ne considère que les éléments bien définis, à savoir le galactose, les sucres aminés et le sulfate, les particularités structurelles des mucopolysaccharides se résument comme suit: le galactose est présent dans le kératan sulfate et dans les séquences de liaison du dermatan sulfate, de l'héparan sulfate et des chondroïtine-sulfates; la galactosamine caractérise le dermatan sulfate, la chondroïtine et les chondroïtine-sulfates; la glucosamine traduit la présence d'acide hyaluronique, d'héparan sulfate et, si l'on observe des quantités égales de galactose, de kératan sulfate; enfin, le sulfate est présent partout, sauf sur l'acide hyaluronique et la chondroïtine.

Contrairement à la biosynthèse, la dégradation normale des divers types de mucopolysaccharides reste encore une grande inconnue que l'étude biochimique des mucopolysaccharides ne peut manquer d'aider à résoudre.

5. Aspects théoriques de la technique de marquage radioactif

Nous venons de voir que les différents types de mucopolysaccharides peuvent être distingués les uns des autres, au

moins partiellement, par leur contenu en sulfate, glucosamine, galactosamine et galactose. De cette constatation est issue l'idée de caractériser les produits de stockage in vitro par le marquage des cellules provenant de patients atteints de mucopolysaccharidoses avec ces précurseurs radioactifs. Théoriquement, on devrait observer les relations prédites sur le tableau 3 entre l'accumulation d'un mucopolysaccharide donné et l'observation d'une augmentation de radioactivité intracellulaire consécutive à l'administration, dans le milieu de culture, d'un précurseur particulier. On constate d'emblée qu'une identification non ambiguë n'est que rarement possible, puisque souvent un même tableau d'augmentation correspond à l'accumulation de deux produits distincts. Cependant, l'ensemble des études in vivo attribuent aux seuls dermatan et héparan sulfates le rôle de définir les tableaux d'accumulation caractéristiques des différents types de mucopolysaccharidoses. Or, il est évident, sur le tableau 3, qu'une distinction nette est réalisée entre l'accumulation d'héparan sulfate, de dermatan sulfate ou des deux. En outre, l'étude de l'accumulation du galactose donne des indications sur l'état de dégradation partielle de ces mucopolysaccharides, puisque ce sucre caractérise la séquence de liaison. Dans nos conclusions, toutefois, nous ne nous bornerons pas à insister sur le dermatan et l'héparan sulfates, mais nous rappellerons également les autres possibilités d'interprétation, sur la base du tableau 3, même lorsqu'elles sont très peu probables au vu des études in vivo et des récentes données enzymatiques.

Cette approche indirecte de caractérisation des produits de stockage in vitro présente l'avantage pratique de ne faire appel à aucune des techniques chimiques de séparation et d'identification des mucopolysaccharides, dont l'application, sur les faibles quantités de matériel livrées par la culture de tissus, est à la fois difficile et sujette à de nombreuses erreurs, ainsi qu'en témoigne le caractère peu concluant et parfois contradictoire des résultats décrits plus haut. Mais il est évident qu'elle ne saurait être valable et digne de confiance que si l'incorporation des précurseurs marqués dans les mucopolysaccharides se fait de façon suffisamment spéci-

fique et efficace. Cette condition est remplie d'office par le sulfate puisque ce produit n'est pas réduit par les cellules de mammifères in vitro et qu'il n'est présent pratiquement que dans les mucopolysaccharides (Fratantoni et al., 1968). Pour les autres substrats, glucosamine, galactosamine et galactose, deux sources d'incorporation non spécifique sont prévisibles. Tout d'abord, ils peuvent s'incorporer en tant que tels dans des molécules autres que les mucopolysaccharides (glycoprotéines, glycolipides, etc...). Ensuite, leur situation dans le métabolisme général des sucres les rend sujets à beaucoup d'interconversions biochimiques susceptibles de transporter les atomes radioactifs sur de nombreux produits (autres sucres, précurseurs d'autres mucopolysaccharides, acides aminés, nucléotides, etc...). Ces interconversions ont été démontrées pour la glucosamine (Kornfeld et Ginsburg, 1966) et il n'est que logique d'admettre un phénomène identique pour la galactosamine et le galactose.

Nous avons par conséquent investi passablement de temps à développer une méthode visant à limiter au maximum l'intensité du marquage non spécifique et à tester l'importance des diverses étapes techniques introduites dans ce but. Les éléments essentiels de cette technique sont fondés sur les considérations suivantes. Tout d'abord, les précurseurs radioactifs se situent, dans le métabolisme des sucres, à des positions telles qu'un jeu de réactions enzymatiques réversibles est en mesure de les convertir en des molécules voisines et, finalement, en des produits nettement différents. Nous avons donc cherché à déplacer ces équilibres dans le sens de la formation du précurseur radioactif en effectuant le marquage dans un milieu nutritif complet contenant, outre de grandes quantités de glucose et d'acides aminés, un large excès des autres précurseurs de mucopolysaccharides à l'état non radioactif. Ce procédé résulte évidemment en une forte dilution du produit marqué entraînant une période de "pulse" de trois jours. Puis, nous souvenant que les cellules mutantes sont affectées dans leur capacité de dégrader certains

mucopolysaccharides, nous incubons les cellules marquées pendant 24 heures sans radioactivité, afin de permettre aux voies cataboliques normales de dégrader les produits autres que ceux touchés par la mutation. La moitié de cette période de "chase" se passe en tampon inorganique, au lieu de milieu nutritif complet, pour affamer les cellules et accélérer ainsi le processus normal de dégradation. En outre, un mélange complet de précurseurs de mucopolysaccharides non radioactifs est ajouté au milieu de "chase" pour diluer les sous-unités marquées libérées et prévenir leur réutilisation. Enfin, les cellules sont soumises à des extractions répétées à l'éthanol 80 % bouillant, afin d'éliminer les restes de substrat radioactif non utilisé et ses dérivés micromoléculaires et de précipiter, entre autres, les mucopolysaccharides (Fratantoni et al., 1968). Le matériel est alors compté par scintillation ou autoradiographié.

6. Efficacité et sélectivité de la technique de marquage

Kraemer (1968 et 1971) a étudié, cinétiquement, l'incorporation de la glucosamine et du sulfate radioactifs et, qualitativement, la nature des produits marqués formés in vitro par des fibroblastes de Hamster chinois. Il constate que la cinétique d'incorporation pour les deux substrats est semblable et qu'après 36 heures, la radioactivité intracellulaire se répartit en trois fractions: une fraction de faible poids moléculaire contenant surtout du sulfate libre et de l'UDP-glucosamine et deux fractions de haut poids moléculaire, l'une, soluble dans l'acide trichloracétique, constituée essentiellement par de l'héparan sulfate libre, l'autre, insoluble dans l'acide trichloracétique, contenant le protéoglycan de l'héparan sulfate. Il conclut donc à une excellente spécificité d'incorporation de la glucosamine. Or, si l'on sait que ses conditions de marquage ne comportent qu'un simple "pulse" en milieu complet en présence de traces de glucosamine et de sulfate radioactifs, sans "chase", sans période de carence nutritive, sans excès de précurseurs froids et sans extraction à l'éthanol, on est logiquement conduit à penser que notre propre technique doit offrir des garanties

de spécificité au moins aussi bonnes. De plus, Philippart (communication personnelle) confirme, sur la base de ses propres expériences avec les glycolipides, que l'incorporation des sucres aminés se fait de façon remarquablement spécifique, lorsque le substrat radioactif est offert en traces aux cellules, en présence d'un large excès de métabolites.

Nous discuterons par ailleurs les résultats de divers essais techniques au cours desquels plusieurs des étapes techniques exposées théoriquement plus haut ont été omises. Nous verrons que les différences de marquage ainsi obtenues par rapport à la méthode standard sont parfaitement explicables dans le cadre de l'hypothèse d'une incorporation spécifique et efficace des précurseurs radioactifs dans les mucopolysaccharides. Enfin, l'étude de l'incorporation du glucose nous démontrera que les interconversions métaboliques ont bien été inhibées avec succès.

Aussi, malgré l'absence d'une caractérisation chimique directe des produits radioactifs formés, nous sommes en mesure de conclure que notre technique de marquage présente vraiment des garanties de spécificité et d'efficacité qui valident l'interprétation des résultats de stockage obtenus avec les lignées mutantes.

7. Marquage des lignées de mucopolysaccharidoses

Nous avons étudié les lignées suivantes: une lignée de Hurler, trois lignées de Hunter, trois lignées de Sanfilippo A, deux lignées de Sanfilippo B et une lignée de Maroteaux-Lamy. Nous n'avons pas cherché à caractériser la maladie de Morquio en raison de sa grande rareté et de sa nature vraisemblablement organe-spécifique. Enfin, nous n'avons pas pu obtenir de souches fibroblastiques dérivées de patients atteints du syndrome de Scheie. Les résultats permettent avant tout de tirer des conclusions quant à la nature des produits de stockage et de relier ces données avec les faits biochimiques et cliniques décrits dans la bibliographie.

Initialement, nous avons pensé que cette approche permettrait également d'établir le diagnostic in vitro des

différents types de mucopolysaccharidoses. C'est cet objectif qui nous a poussés à analyser le matériel marqué, non seulement par comptage de scintillation, mais aussi par autoradiographie, en raison des très faibles quantités de cellules que cette technique exige. Ce but n'a pas été atteint en ce qui concerne les sucres précurseurs. En effet, les différences d'incorporation pour ces derniers sont faibles et ne peuvent s'interpréter de façon significative que si l'on envisage des valeurs moyennes fondées sur plusieurs expériences. Ainsi, une grande quantité de matériel est de toute façon nécessaire. De plus, l'autoradiographie exige, pour détecter ces faibles différences, un comptage des grains, lent et pénible, qui diminue considérablement l'intérêt de cette technique au profit du simple dosage par scintillation. Enfin, la galactosamine et le galactose, pour des raisons discutées plus loin, se prêtent mal à une analyse quantitative des résultats autoradiographiques. Un obstacle plus fondamental à l'emploi diagnostic de notre méthode réside dans la nature exceptionnelle de certains résultats qui ne confirment pas les faits connus *in vivo*. Si ces nouvelles données présentent, de par leur nouveauté même, un intérêt considérable, elles n'en diminuent pas moins la valeur diagnostic appliquée de cette étude puisqu'elles appellent une vérification indépendante par d'autres laboratoires, avant que de pouvoir être admises de façon définitive.

Les remarques précédentes concernent l'incorporation des sucres. Par contre, l'accumulation du sulfate est extrêmement nette et peut se juger avec une absolue sûreté à la suite d'une seule détermination. En autoradiographie, les différences entre lignées normales et mutantes sont évidentes après un simple examen purement qualitatif des préparations. Ainsi, pour ce précurseur, notre méthode représente une technique simple, efficace et rapide de diagnostic, ne nécessitant que de très faibles quantités de matériel. Certes, ce diagnostic est atypique mais son intérêt est évident pour une détection prénatale des mucopolysaccharidoses. En effet, dans ce cas, une identification précise du type de mucopolysaccharidoses n'est pas requise, puisque l'histoire génétique de la famille

nous renseigne. Par contre, il est évidemment avantageux de n'avoir besoin que de très petites quantités de cellules en raison des délais nécessaires à l'établissement de lignées cellulaires à partir des cellules foetales du liquide amniotique.

En plus de cette application essentiellement diagnostic, l'autoradiographie nous permet, au contraire du comptage par scintillation, d'examiner le phénotype de chaque cellule et nous renseigne ainsi sur le degré d'homogénéité de la population vis-à-vis du marquage. Nous verrons que cet aspect de nos résultats soulève un certain nombre de questions intéressantes qui font de l'autoradiographie un complément utile et pertinent de nos études par scintillation.

MATERIEL ET TECHNIQUES

1. Lignées cellulaires : Toutes nos lignées sont dérivées de fibroblastes cutanés humains. Les cultures normales proviennent de donneurs adultes normaux ou décédés accidentellement, ainsi que d'enfants hospitalisés pour diverses raisons. On établit, dans notre laboratoire, à partir de biopsies cutanées, sept lignées mâles et deux lignées femelles. L'analyse cytogénétique de ces souches de contrôle confirme l'absence d'anomalies chromosomiques et l'étude cinétique d'incorporation du sulfate radioactif selon Fratantoni et al. (1968) présente un profil normal.

Le type, la désignation et les principales caractéristiques des lignées mutantes sont rassemblés sur le tableau 4.

La plupart de ces souches ont été utilisées pendant plusieurs mois, sans interruption ou avec des périodes de stockage à l'état congelé. Ces facteurs n'ont pas affecté de façon sensible les résultats. Toutefois, nous avons pris soin de ne jamais utiliser de lignées en sénescence.

2. Conditions de culture : On distingue les cultures de routine et les cultures expérimentales. Dans les deux cas, les cellules sont incubées à 37°C, en présence de milieu EBM (Eagle's basal medium) (GIBCO) renforcé avec 20 % v/v de sérum de veau embryonnaire (FLOW). Les antibiotiques suivants sont présents: 100 unités/ml de pénicilline (GIBCO), 100 µg/ml de streptomycine (GIBCO) et 0.25 µg/ml de fungizone (GIBCO). Le contrôle du pH est assuré par la présence de 0.1 % p/v de bicarbonate de sodium dans le milieu et par l'incubation sous une atmosphère de CO₂ à 5 % dans l'air. Les cultures de routine sont maintenues dans des "milk-dilution bottles" de verre Pyrex, les cultures expérimentales, dans des "T-flasks" de plastique (FALCON) d'une surface utile de 25 cm². Pour assurer une croissance normale sur plastique, il est nécessaire de renforcer le milieu des cultures expérimentales avec 500 mg/l de glutamine (DIFCO). Récemment, Lie et al. (1972, 1973) ont souligné l'importance du pH dans l'expression

d'un stockage de mucopolysaccharides in vitro. Partant, nous avons essayé de cultiver nos cellules en présence d'acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES) (CALBIOCHEM), puisque cet ampholyte présente vers pH 7 - 7.5 une bien meilleure capacité tampon que le bicarbonate (Good et al., 1966). Malheureusement, le développement normal des cellules est inhibé à un point tel que nous avons dû abandonner ces essais. Nous nous sommes alors contentés d'exercer un contrôle strict de la couleur du milieu en présence de rouge de phénol. Dans tous les cas, le pH ainsi estimé s'est maintenu entre 7 et 7.3 pendant les expériences.

Le repiquage des cultures confluentes s'effectue à l'aide d'une solution de trypsine à 0.2 % p/v (DIFCO) dans le tampon de Dulbecco (phosphate buffered saline = PBS), privé de calcium et de magnésium.

Tous les réactifs, milieux et solutions sont dépourvus de sulfate, de galactosamine, de glucosamine et de galactose, à l'exception des traces présentes dans le sérum.

3. Substrats radioactifs : Le tableau 5 donne la liste des différents substrats radioactifs utilisés et indique leur structure exacte. Tous sont marqués nominalement sur un atome donné, sauf le galactose qui présente un marquage général. Une dose uniforme de 3 $\mu\text{Ci/ml}$ est ajoutée aux différents milieux d'incubation.

A l'exception du sulfate, tous ces substrats sont livrés en solution éthanol-eau de proportions variables. De ce fait, une petite quantité d'éthanol est introduite dans le milieu de culture lors de l'addition de la dose radioactive. Pour les substrats marqués au tritium, la concentration finale d'éthanol ne dépasse pas 0.3 % v/v et n'affecte en rien la croissance des cellules. Par contre, l'activité spécifique par unité de volume beaucoup plus faible de la solution de galactosamine- $[1-^{14}\text{C}]$ entraîne une concentration finale de 2.1 % v/v d'éthanol, qui n'est plus compatible avec une croissance normale. Nous avons donc remplacé l'usage de la solution éthanolique de galactosamine- $[1-^{14}\text{C}]$ par l'addition d'un aliquot de solution aqueuse fraîchement préparée à partir du produit sec.

4. Substrats non radioactifs : Pour chaque substrat radioactif, on définit, sur la base des considérations théoriques de l'introduction, un mélange complémentaire de précurseurs non marqués des mucopolysaccharides. Le tableau 5 donne la composition de ces différents mélanges. Dans chaque cas, on prépare une solution-stock aqueuse équimoléculaire des précurseurs non radioactifs voulus. De plus, une solution analogue contenant l'ensemble des précurseurs de mucopolysaccharides est préparée en vue du "chase". La concentration molaire de toutes ces solutions est ajustée de telle sorte qu'un aliquot de quelques μ l par 100 ml de milieu d'incubation résulte en une concentration finale de produits froids cent fois plus élevée que la concentration de molécules radioactives, déterminée à partir de l'activité molaire spécifique de chaque lot de produits marqués. De ce fait, la concentration finale exacte de précurseurs froids, quoique identique pour chacun dans un cas donné, varie selon le substrat radioactif utilisé. Cependant, l'ordre de grandeur est toujours voisin de 4×10^{-2} mM. Par comparaison, la concentration de glucose présente dans le milieu EBM est de 5.5 mM, ce qui explique que nous n'ajoutions aucun glucose non marqué supplémentaire, lors du marquage avec ce précurseur. L'activité spécifique molaire de la galactosamine- $[1-^{14}\text{C}]$ étant beaucoup plus faible que celle des précurseurs marqués au tritium, l'addition de précurseurs froids en excès n'a pu se faire ici en raison des énormes quantités de produits qui auraient été exigées. Enfin, l'acide iduronique, bien que précurseur de certains mucopolysaccharides, ne figure pas dans nos mélanges car il n'est pas disponible sur le marché.

5. Technique de marquage : Sur la base de considérations théoriques et d'expériences préliminaires, une technique standard s'est imposée. Nous la décrivons ci-dessous en réservant pour plus tard la description des essais préliminaires qui justifient ses diverses étapes. Elle se décompose essentiellement en trois temps: (1) marquage proprement dit pendant trois jours ("pulse"); (2) période d'incubation sans radioactivité pendant 24 heures ("chase");

(3) traitement du matériel cellulaire en vue des analyses par scintillation ou par autoradiographie.

1. Pour chaque lignée cellulaire et chaque substrat radioactif, inoculer un "T-flask" avec un nombre de cellules suffisant pour atteindre la confluence de la culture en 3-4 jours.
2. Une fois la culture confluyente, remplacer le milieu normal par 5 ml de milieu EBM frais contenant 3 μ Ci/ml du substrat radioactif voulu et l'excès défini plus haut du mélange correspondant de précurseurs non marqués (voir tableau 5).
3. Incuber pendant trois jours.
4. Rincer trois fois les cultures avec du PBS.
5. Incuber les cultures pendant 12 heures en présence de 5 ml de PBS contenant le mélange complet de précurseurs non marqués dans le même excès qu'au point 2.
6. Remplacer le tampon PBS par 5 ml de milieu EBM contenant le même excès de précurseurs non marqués qu'en 5 et incuber pendant 12 heures.
7. Après trypsinisation, centrifugation et lavage au PBS, les cellules sont remises en suspension dans 3 ml de PBS. Cette suspension constitue le produit de départ des procédés analytiques par comptage de scintillation et par autoradiographie.

Dans tous les cas, l'incubation se fait à 37°C, sous atmosphère de CO₂ à 5 %, lorsque les cellules sont dans le milieu EBM, sous atmosphère d'air, lorsqu'elles sont dans le PBS.

6. Comptage par scintillation : A cet effet, la suspension de cellules du point 7 est soumise à trois extractions successives dans l'éthanol 80 % v/v bouillant selon la technique de Fratantoni et al. (1968). Le sédiment final, éthanol-insoluble, de chaque culture est alors dissout dans 1 ml de NaOH 10 % p/v à 80°C.

0.5 ml de cette solution est mélangé à 9.5 ml du mélange scintillant suivant: 0.2 % p/v 2,5-diphényloxazole (PACKARD)

et 0.04 % p/v 1,4-bis-[2-(4-méthyl-5-phényloxazolyl)]-benzène (PACKARD) dans du toluène (MERCK, pro anal.) / 2-méthoxy-éthanol (MERCK, pro anal.) 1:1 (Wiesmann, communication personnelle). Les flacons sont comptés contre un blanc de NaOH 10 % p/v (0.5 ml dans 9.5 ml de mélange scintillant) dans un 3324 Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrophotometer.

La concentration en protéines de la solution alcaline de cellules est déterminée par la méthode de Lowry et al. (1951), en double, sur 0.2 ml de solution chaque fois. On utilise des réactifs MERCK (pro anal.) et un spectrophotomètre Zeiss.

Les données du comptage et du dosage des protéines sont combinées pour exprimer les résultats en coups/minute/mg de protéines (cpm/mg prot.).

7. Autoradiographie : 0.5 ml de la suspension finale de cellules (point 7 de la technique standard) est utilisé pour inoculer 4 ml de milieu EBM, en présence d'un couvre-objet de 24 x 40 mm, dans une boîte de Pétri. Ces cultures sont incubées pendant le temps nécessaire aux cellules pour se fixer et s'étaler sur le couvre-objet, soit environ 3-4 heures. Les préparations sont alors rincées deux fois au PBS, plongées pendant 3 x 3 minutes dans trois solutions bouillantes d'éthanol 80 % v/v, fixées pendant 2 x 5 minutes au méthanol absolu et séchées à l'air.

On découpe alors chaque couvre-objet en quatre parties égales qui sont collées à l'Euparal (CHROMAGESELLSCHAFT), face portant les cellules vers le haut, sur une lame porte-objet dans toutes les combinaisons désirées pour associer, sur une même lame, des cellules provenant de cultures différentes. On diminue ainsi l'influence, sur la dispersion des résultats, de différences dans le rendement en grains entre les préparations, attribuables, entre autres, à des fluctuations mal contrôlables de l'épaisseur de la couche d'émulsion.

Une fois sèches, les lames sont recouvertes d'émulsion liquide Ilford G5 selon les techniques standards (Rogers, 1969). Les préparations marquées au tritium sont plongées dans

de l'émulsion diluée 1:1 avec de l'eau bidistillée. Les préparations marquées au ^{14}C ou au ^{35}S , en raison de l'énergie plus forte d'émission de ces isotopes, sont recouvertes d'émulsion pure. Les lames sont exposées à 4°C . Le temps d'exposition est déterminé à l'aide de quelques lames-témoins développées à interval régulier.

Le traitement photographique des autoradiographies s'effectue selon les techniques habituelles avec le révélateur Kodak D19b et le fixateur Kodak Metafix, dilués selon les instructions du fabricant. Un développement de 4 minutes à 20°C et une fixation de 4 minutes, après rinçage à l'eau, représentent les conditions optimales pour obtenir des grains de grande dimension sans bruit de fonds gênant.

Directement après lavage (≥ 10 minutes à l'eau courante), les préparations sont colorées à travers l'émulsion avec la solution suivante: solution-stock de Giemsa (MERCK), 2,5 % v/v, méthanol, 3 % v/v, Na_2HPO_4 0.2 M, 3 % v/v et acide citrique 0.1 M, 3 % v/v dans l'eau distillée. Après 8 minutes, les lames sont rincées pendant 2×5 minutes à l'eau distillée et séchées à l'air. Finalement, on les monte à l'Euparal.

Dans la plupart des expériences décrites plus loin, un aliquot de la suspension de cellules initiale (point 7 de la technique standard) a été analysé par autoradiographie et le reste compté par scintillation, de telle sorte que les résultats des deux techniques s'appliquent vraiment au même matériel.

8. Analyse des résultats : Sur la base des données autoradiographiques exprimées en nombre de grains par cellule et des résultats du comptage par scintillation en cpm/mg prot., on calcule les grandeurs suivantes:

1. Valeur zéro: moyenne des résultats d'incorporation observés pour toutes les lignées normales dans le cadre d'une expérience donnée.

2. Ecart-type du zéro: écart-type calculé sur la moyenne définie en 1. dans le cadre d'une expérience donnée.

3. Ecart-type moyen du zéro: moyenne des écarts-types individuels (2.) obtenus au cours d'une série d'expériences diffé-

rentes.

4. % de différence d'incorporation: différence entre la valeur zéro (1.) et la valeur observée pour un mutant donné, exprimée en % de la valeur zéro, dans le cadre d'une expérience donnée.

5. % de différence moyen: moyenne des % de différence d'incorporation (4.) pour un mutant donné obtenus au cours d'une série d'expériences différentes.

6. Ecart-type du % de différence moyen: écart-type calculé sur le % de différence moyen (5.) à partir des % de différence individuels (4.).

Pour juger si un résultat est significatif ou pas, nous nous sommes fondés sur les critères semi-empiriques suivants: si un % de différence (4. ou 5.) tombe dans le domaine de l'écart-type du zéro, le résultat est considéré comme non significatif; si les écarts-types du zéro (2. ou 3.) et d'un % de différence moyen (6.) se recouvrent partiellement, le résultat est considéré comme peu significatif; enfin, si ces mêmes écarts-types ne se recouvrent pas, le résultat est considéré comme significatif.

Dans la pratique, nous comparerons surtout des % de différence moyens fondés sur plusieurs expériences. De par la nature même de nos mutants, seuls des % positifs, c'est-à-dire traduisant une augmentation de l'incorporation, seront discutés.

La pratique d'analyse qui consiste à calculer séparément, pour chaque expérience, les % de différence et ensuite seulement à les combiner en une moyenne, représente le seul moyen d'éliminer du domaine de dispersion des paramètres mal définis qui influent, d'une expérience à l'autre, sur l'ensemble des résultats bruts d'incorporation de la même manière.

Pour les résultats autoradiographiques, on sélectionne les cellules bien étalées sur le couvre-objet et le nombre de grains par cellule est alors déterminé sur 50 cellules dans chaque cas. Lorsque des cellules issues d'une même lignée et d'une même expérience sont présentes sur plusieurs prépara-

tions, on se contente, généralement, pour les préparations supplémentaires, de ne plus compter que 25 cellules. En dépit d'une dispersion alors plus grande du comptage, les résultats restent aussi significatifs que ceux fondés sur 50 cellules.

Mentionnons encore pour terminer que les expériences cinétiques décrites plus loin ont été analysées selon les principes développés par Fratantoni et al. (1968) dans leurs études d'incorporation du sulfate: pour chaque jour de "pulse", on porte sur le graphique l'incorporation brute en cpm/mg prot.; pour chaque jour de "chase", on porte le % de radio-activité intracellulaire résiduel, calculé sur la base de la différence, pour une lignée donnée, entre l'activité en cpm/mg prot. au temps 0 (avant le début du "chase") et celle mesurée au temps t. Nous rendons donc le lecteur attentif au fait que les valeurs en % utilisées dans ces études n'ont pas la même signification que celles définies plus haut pour nos propres expériences non cinétiques.

ETUDE DE LA TECHNIQUE DE MARQUAGE

Diverses expériences permettent, conjointement avec les résultats d'autres laboratoires discutés dans l'introduction, d'évaluer la sensibilité et la spécificité de notre propre technique standard. Deux sortes d'essais ont été effectués pour cela. Tout d'abord, des études cinétiques de l'incorporation des différents précurseurs marqués de mucopolysaccharides et du glucose tritié conduisent à une définition de la durée optimale des phases de "pulse" et de "chase" et mettent en évidence des différences fondamentales entre le comportement du sulfate et de la glucosamine, d'une part, du glucose et du galactose, d'autre part. Ensuite, les résultats d'incorporation et d'accumulation, observés dans les conditions standards, sont comparés à ceux fournis par diverses modifications de ces dernières. Ces tests nous permettent indirectement d'évaluer le bien-fondé et l'efficacité des diverses étapes techniques.

Seul le comptage par scintillation a été utilisé ici. En effet, mieux et plus rapidement que l'autoradiographie, il permet d'obtenir les résultats quantitatifs dont nous avons besoin pour ces comparaisons techniques. Par ailleurs, l'incorporation de la galactosamine- $[1-^{14}\text{C}]$ n'a pas été étudiée sous cet angle méthodologique, en raison du prix prohibitif de ce produit. Nous extrapolerons donc sans plus les résultats fondés sur le sulfate, la glucosamine, le galactose et le glucose à ce précurseur dans l'analyse des données de marquage comparée entre lignées normales et mutantes.

1. Etudes cinétiques

L'évolution de l'incorporation de précurseurs marqués au cours du temps s'obtient en faisant varier la période d'exposition des cellules au milieu radioactif approprié (voir tableau 5). A des intervalles donnés, un échantillon de culture est prélevé et traité directement pour le comptage par scintillation, sans passer par une période de "chase".

Toutes les autres conditions (composition des milieux, extraction à l'éthanol, etc...) sont identiques à celles de la méthode standard. La perte de radioactivité intracellulaire au cours du temps est estimée en faisant varier la longueur du "chase" après un "pulse" constant de trois jours. Par opposition à la technique standard, cette période variable de "chase" se déroule exclusivement dans le milieu EBM, sans passage des cellules dans le PBS. Les autres conditions ("pulse", extraction à l'éthanol, etc...) sont identiques à celles de la méthode standard.

En considérant l'allure générale des courbes portées sur les figures 1-4 (A et B), on note d'emblée une différence fondamentale dans les profils d'incorporation (A) et de "chase" (B) entre le sulfate (figure 1) et la glucosamine (figure 2), d'une part, le glucose (figure 3) et le galactose (figure 4), d'autre part. Alors que les deux premiers provoquent une augmentation continue de radioactivité pendant les 4 premiers jours au moins (figures 1-A et 2-A), le glucose (figure 3-A) et le galactose (figure 4-A) atteignent, après un jour déjà, un niveau de saturation au delà duquel la radioactivité intracellulaire n'augmente plus significativement, voire même, pour le glucose, diminue. Lors du "chase", l'activité intracellulaire issue du marquage avec le sulfate (figure 1-B) et la glucosamine (figure 2-B) diminue dès que le précurseur radioactif est enlevé. Par contre, le glucose (figure 3-B) et le galactose (figure 4-B) conduisent à une activité significativement plus élevée après un jour de "chase".

Nos données ne nous permettent pas d'expliquer en détail la raison de ces importantes différences. On pourrait supposer que la fraction intracellulaire de molécules susceptibles d'être marquées est plus petite pour le glucose et le galactose que pour la glucosamine et le sulfate, ce qui entraîne une saturation plus rapide. C'est toutefois peu probable pour deux raisons. Tout d'abord, on sait que le sulfate n'est incorporé pratiquement que dans les mucopolysaccharides (Frantoni et al., 1968). Donc la fraction de molécules qu'il

est capable de marquer ne saurait être plus grande que celles du glucose et du galactose, métabolites éminemment convertibles. Ensuite, l'augmentation de radioactivité intracellulaire issue du glucose et du galactose après un jour de "chase" indique que les fractions impliquées ici ne sont pas saturées. Une autre explication fait intervenir la conversion du glucose en acide lactique par anaérobiose, qui constitue le principal mode de respiration des cellules in vitro (Paul, 1970). Le lactate n'étant plus réutilisable, cette voie métabolique constitue donc un cul-de-sac qui appauvrit constamment la fraction de sucres utilisables. Cependant, comme la dose radioactive est donnée une fois pour toutes en début d'expérience et que les conditions de milieu ne sont ensuite plus changées de l'extérieur, on voit mal comment ce phénomène serait à même de modifier l'activité spécifique du "pool" total de métabolites. Enfin, on peut invoquer l'établissement plus rapide d'un "turn-over" dynamique pour le glucose et le galactose que pour le sulfate et la glucosamine, sans que nos résultats nous permettent de définir plus avant ce phénomène. Il n'en reste pas moins que, quelle que soit l'explication sous-jacente, la cinétique d'incorporation du glucose et du galactose se distingue nettement de celle du sulfate et de la glucosamine et indique que des fractions moléculaires différentes sont marquées par ces produits.

Dans le cas du "chase", il est évident que, après lavage de la radioactivité extracellulaire, le galactose et le glucose intracellulaires marqués, et/ou leurs dérivés, continuent d'être fixés sur des molécules éthanol-insolubles: si l'on étudie, en fonction du temps, le "chase" de la radioactivité intracellulaire totale et non plus seulement celui de la fraction éthanol-insoluble (figure 3-B, courbe sans extraction), alors une décroissance immédiate et continue est observée. Il ne nous est pas possible de définir la nature des produits éthanol-insolubles qui sont responsables du comportement particulier du glucose et du galactose. Il est toutefois évident qu'il ne peut s'agir, en quantité appréciable, de mucopolysaccharides, puisque le sulfate ne présente précisément pas le même profil de "chase". Ainsi, quelle que

soit l'explication biochimique précise de ces résultats, ils n'en conduisent pas moins à l'importante conclusion que notre technique aboutit à un marquage de fractions moléculaires éthanol-insolubles différentes, selon que le sulfate et la glucosamine ou bien le glucose et le galactose sont fournis aux cellules. Or, le sulfate n'étant incorporé pratiquement que dans les mucopolysaccharides (Fratantoni et al., 1968), il n'est que logique de conclure que la glucosamine est elle aussi fixée efficacement et spécifiquement sur ces macromolécules, alors que le glucose et le galactose ne le sont que peu ou pas du tout. Par conséquent, la technique standard conduit à une inhibition efficace des interconversions métaboliques de ces sucres en d'autres précurseurs de mucopolysaccharides et, partant, assure une incorporation spécifique de la glucosamine, tout en dirigeant le glucose et le galactose vers d'autres voies.

Une autre différence importante entre le sulfate et la glucosamine d'une part, le glucose et le galactose, d'autre part, est implicitement contenue dans les figures 1-4 (A et B). Pour le glucose et la galactose, aucune différence significative de l'activité intracellulaire n'est apparue dans ces expériences cinétiques entre les cellules mutantes utilisées et les contrôles normaux. Cette constatation, appuyée par d'autres résultats discutés plus loin, nous a permis, pour ces deux sucres, de présenter des courbes uniques (figures 3 et 4, A et B) dont chaque point représente la moyenne de plusieurs lignées mutantes et normales. Par contre, pour le sulfate, lors du "pulse" (figure 1-A) et du "chase" (figure 1-B), et la glucosamine, lors du "chase" seulement (figure 2-B), une séparation des profils cinétiques des souches mutantes et normales met en évidence des différences significatives. Or, si l'on se rappelle que les mutants étudiés sont caractérisés par un défaut de dégradation des mucopolysaccharides, ces différences correspondent au résultat théoriquement prévisible pour le sulfate et confirment, en fait, les travaux de Fratantoni et al. (1968). De plus, elles appuient également l'idée que la glucosamine, au contraire du glucose et du galactose, est incorporée dans les mucopolysaccha-

rides. Par ailleurs, l'absence de différences significatives entre l'activité des lignées mutantes et normales pour le galactose est intéressante à un autre titre. En effet, ce sucre est un constituant de la région de liaison des mucopolysaccharides (voir l'introduction). Il semble donc que les produits de stockage dans les cellules mutantes utilisées sont partiellement dégradés et dépourvus de cette séquence particulière. Nous reviendrons plus loin sur cette intéressante conclusion confirmée par d'autres résultats encore.

Dans le cas de la glucosamine (figure 2-A), on notera qu'aucune différence significative entre mutants et normaux n'apparaît lors du "pulse", au contraire du sulfate (figure 1-A). Ceci s'explique par le fait que ces études de "pulse" ont été effectuées sans "chase". Ainsi que nous le verrons plus loin, cette dernière étape est nécessaire pour mettre en évidence des % d'augmentation significatifs avec les sucres aminés. Au vu de l'ensemble de nos résultats, cette absence de différence sur la figure 2-A est donc normale et confirme l'utilité de l'étape de "chase". Cependant, elle indique également que notre technique n'est pas aussi bonne qu'on le voudrait, puisqu'un parallélisme absolu entre sulfate et glucosamine ne peut être atteint. Sans doute, cette remarque s'applique aussi à la galactosamine.

Les études avec le sulfate (figure 1-A) nous permettent de définir la durée optimale de "pulse" en relation avec le métabolisme intracellulaire des mucopolysaccharides. On voit que les différences entre les cellules normales et mutantes augmentent avec le temps. Il serait donc désirable d'attendre aussi longtemps que possible. Mais le milieu des cultures expérimentales confluentes s'acidifie rapidement. Il est nécessaire au bout de trois jours de le renouveler pour assurer un état physiologique normal aux cellules. Comme le changement du milieu de "pulse" radioactif en cours d'expérience aurait entraîné, non seulement de plus grands délais, mais aussi des quantités doublées de produits marqués coûteux, nous avons introduit une durée de "pulse" de trois jours dans la technique standard.

La durée de "chase" se détermine facilement en considérant la cinétique du sulfate (figure 1-B). En raison du turn-over ralenti, mais non nul, des cellules mutantes, l'augmentation de radioactivité intracellulaire dans ces dernières passe par un maximum après un jour de "chase". Pour la glucosamine (figure 2-B), toutefois, ce maximum n'est atteint qu'au bout de 2-3 jours. Ceci reflète probablement le fait qu'une quantité plus considérable de radioactivité non spécifique doit être dégradée dans ce cas, avant que la différence de stockage de mucopolysaccharides entre mutants et normaux puisse pleinement s'exprimer. Ainsi se trouve à nouveau confirmée l'importance de l'étape de "chase" et les performances moins bonnes de notre technique pour les sucres aminés. Cependant, on se souviendra que la période de "chase" variable dans les expériences cinétiques se déroule exclusivement dans le milieu EBM, sans passage dans le PBS. Or, nous verrons plus loin que cette phase de carence se révèle très efficace pour stimuler les processus de dégradation qui affectent les molécules marquées non touchées par les mutations des mucopolysaccharidoses. Aussi, les courbes de la figure 2-B ne sont certainement pas des miroirs fidèles de l'évolution de la radioactivité intracellulaire au cours du temps dans les conditions standards. De plus, en raison des limites méthodologiques mentionnées plus haut, il est évident que l'analyse cinétique du sulfate illustre mieux que celle de la glucosamine le métabolisme des seuls mucopolysaccharides. Ces considérations, jointes au désir de formuler des conditions standards identiques pour chaque précurseur, nous ont conduits à adopter une durée de "chase" de un jour.

2. Modifications de la technique standard

L'importance de trois étapes techniques a été étudiée: l'extraction à l'éthanol, la période de "chase" et la phase de carence en tampon inorganique pendant cette dernière. Les expériences ont consisté à traiter des cellules, mutantes et normales, dans les conditions standards en omettant, chaque fois, soit l'extraction à l'éthanol, soit le "chase", soit les deux, soit encore la période de carence ("chase" dans EBM).

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 6 à 9. Les chiffres accompagnés d'un écart-type représentent des moyennes fondées sur au moins deux déterminations indépendantes. Les autres ne sont issus que d'une seule. Il est évident que nous n'avons pas pu, ni voulu, tester ces conditions modifiées sur l'ensemble des lignées cellulaires utilisées dans cette étude.

Dans ce type d'expériences, les résultats sont prévisibles pour le sulfate, si l'on tient compte des considérations théoriques émises dans l'introduction. Si l'étape omise permet effectivement la perte d'une certaine quantité de radioactivité, les résultats du dosage total de cette dernière doivent montrer des valeurs plus fortes que les valeurs standards. Si en plus, comme nous l'espérons, cette diminution d'activité est le fait d'une dégradation ou d'une extraction de produits autres que les mucopolysaccharides, les % de différence entre mutants et normaux, dans l'expérience modifiée, doivent être significativement plus faibles, en dépit des activités globales plus élevées. En bref, une diminution du % de différence pour le sulfate accompagnée d'une augmentation de l'activité globale permet de conclure que l'étape omise dans l'expérience impliquée est utile pour mieux détecter ce qui se passe au niveau du stockage des mucopolysaccharides. En outre, par analogie avec la démarche suivie lors des expériences cinétiques, tout sucre dont l'incorporation varie parallèlement à celle du sulfate au cours des mêmes essais doit être considéré comme associé aux mucopolysaccharides, alors qu'un comportement différent indique, dans les limites de sensibilité de la méthode, que cette association est peu probable.

L'extraction à l'éthanol se révèle utile avant tout pour la glucosamine (tableau 7). En son absence, les activités globales sont significativement plus fortes, mais les % de différence, pour les lignées qui présentent des valeurs positives dans les conditions standards, sont plus faibles. Ainsi, cette étape permet de mieux dégager du bruit de fonds l'activité spécifiquement liée aux mucopolysaccharides. Pour le glucose (tableau 8) et le galactose (tableau 9), les

activités globales sont certes plus élevées, mais les % de différence, déjà voisins de zéro dans les conditions standards, varient de façon désordonnée et restent, en général, statistiquement inchangés. Pour le sulfate (tableau 6), l'extraction à l'éthanol ne revêt pas de caractère indispensable: les activités globales sont, soit légèrement augmentées, soit statistiquement identiques, et les % de différence, à deux exceptions près (G.C. et L.T.) où une augmentation est observée, restent identiques. Cette relative insensibilité du marquage avec le sulfate vis-à-vis de l'extraction à l'éthanol est confirmée par Wiesmann (communication personnelle). Elle se laisse expliquer par le fait que ce précurseur participe beaucoup moins que les sucres à des métabolismes autres que celui des mucopolysaccharides et conduit, partant, à des quantités plus faibles de marquage non spécifique, que le "chase", à lui seul, suffit pratiquement à éliminer.

L'étape de "chase" est absolument nécessaire pour une bonne détection de la radioactivité fixée sur les mucopolysaccharides. Tant dans le cas du sulfate (tableau 6) que dans celui de la glucosamine (tableau 7), son omission conduit à des activités globales beaucoup plus élevées et des % de différence significativement réduits. Pour le glucose (tableau 8) et le galactose (tableau 9), les activités sont également plus élevées, mais les % de différence varient de façon opposée à ceux du sulfate. Ceci permet de conclure que le comportement de ces deux sucres n'a rien à voir avec le métabolisme des mucopolysaccharides.

Enfin, l'omission du "chase" et de l'extraction à l'éthanol confirme les résultats précédents en révélant, de façon plus ou moins additive, une augmentation d'activité globale pour tous les précurseurs marqués, une diminution des % de différence pour le sulfate (tableau 6) et la glucosamine (tableau 7) et des % pratiquement inchangés pour le glucose (tableau 8) et le galactose (tableau 9).

Selon l'hypothèse initiale, la période de carence dans le PBS pendant le "chase" devrait stimuler les cellules à dégrader leurs réserves mobilisables, c'est-à-dire celles

dont le catabolisme n'est pas affecté par les mutations que nous étudions ici. De ce fait, une prolongation de cette période sur 24 heures doit conduire à des activités globales plus faibles et des % de différence plus élevés. Les résultats d'une telle expérience pour le sulfate sont donnés sur le tableau 6 ("chase" dans PBS). Ils ne répondent qu'imparfaitement à l'attente théorique. A cela, deux explications, toutes les deux probablement impliquées simultanément dans l'effet observé. Tout d'abord, le sulfate ne saurait jouer de rôle important dans la constitution de produits mobilisables autres que les mucopolysaccharides et, partant, ne devrait pas être beaucoup affecté par l'étape de carence. Ensuite, après 24 heures d'exposition à un tampon inorganique, les cellules sont endommagées. Certes, des tests qualitatifs ont démontré que les cultures confluentes utilisées étaient encore capables, après 48 heures dans le tampon, de récupérer lorsqu'un milieu complet leur est offert. Cependant, ceci ne va pas sans la mort et le décollement d'un grand nombre de cellules, sans un changement dramatique de leur morphologie (elles deviennent beaucoup plus filiformes et plus petites) et sans une extension considérable du temps nécessaire à leur fixation sur une nouvelle surface, lorsqu'elles sont trypsinisées dans cet état carencé. Ces effets sont déjà sensibles au bout de 24 heures et nous forcent à considérer avec prudence les résultats du "chase" dans le PBS pour le sulfate, puisque, en comparaison avec les chiffres standards, il s'agit ici de cellules qui ne sont plus dans le même état physiologiquement sain. Par contre, 12 heures dans le PBS, tout en modifiant déjà un peu la morphologie des cellules, ne provoquent aucun dommage qui ne soit pas totalement réversible en quelques heures, lorsque le milieu EBM est à nouveau fourni aux cultures. Est-ce toutefois encore suffisant pour retirer le bénéfice escompté de la période de carence? Les résultats d'un "chase" sans période de carence ("chase" dans EBM) pour la glucosamine (tableau 7) apportent une réponse positive nette: les activités globales sont beaucoup plus élevées et les % de différence plus faibles. Ainsi, 12 heures dans le PBS suffisent à influencer les résultats dans le sens désiré théoriquement. Pour le glucose (tableau 8) et le galactose (tableau 9), les activités

sont également plus fortes à la suite d'un "chase" en milieu EBM, mais les % de différence varient de façon non compatible avec l'hypothèse d'une fixation de ces produits sur les mucopolysaccharides.

En résumé, l'analyse de ces résultats permet de conclure au bien-fondé des différentes étapes techniques étudiées. A des degrés divers, elles concourent toutes à augmenter l'efficacité et la spécificité de détection d'un stockage de mucopolysaccharides. L'étape de "chase" est tout particulièrement importante; la période de carence et l'extraction à l'éthanol se révèlent utiles pour la glucosamine surtout. Par ailleurs, on aura noté, dans ces expériences, une différence de comportement entre le sulfate et la glucosamine, d'une part, le glucose et le galactose, d'autre part. On a donc ici une deuxième série d'évidences indiquant que la glucosamine est bien incorporée sur les mucopolysaccharides, alors que le glucose et le galactose ne le sont que peu ou pas du tout. Si, dans le cas du glucose, l'inhibition efficace des interconversions métaboliques se trouve ainsi, une fois de plus, confirmée, ces résultats suggèrent aussi, pour le galactose, que les mucopolysaccharides stockés sont dépourvus de région de liaison.

Cependant, il faut noter que la lignée cellulaire de Maroteaux-Lamy (M.) se comporte, avec le galactose (tableau 9), d'une façon différente des autres. Dans ce cas, l'omission des diverses étapes techniques conduit à des activités globales plus fortes et à des % de différence plus faibles, c'est-à-dire à une évolution identique à celle notée pour le sulfate et la glucosamine. On est ainsi amené à l'importante conclusion que cette lignée, contrairement aux autres, incorpore significativement le galactose dans ses produits de stockage pathologiques. Nous reviendrons plus loin sur ce point et sur son interprétation.

3. Evaluation de la technique standard

Les divers essais techniques discutés plus haut peuvent se réduire aux conclusions suivantes:

1) La glucosamine et le sulfate se comportent de façon qualitativement identique, ce qui prouve que le sucre aminé est bien incorporé dans les mucopolysaccharides.

2) Le glucose donne des résultats nettement différents de ceux du sulfate et de la glucosamine, ce qui indique que les interconversions métaboliques visant à le convertir en précurseurs de mucopolysaccharides sont efficacement inhibées.

3) Le galactose suit, à une exception près (M.), le comportement du glucose: il n'est donc pas présent dans les mucopolysaccharides stockés dans les lignées mutantes en question, ceci, bien sûr, dans les limites de sensibilité de la méthode.

4) Dans tous les cas, une modification donnée de la technique de marquage conduit à des résultats dont la différence avec les chiffres standards est compatible avec les considérations théoriques qui prédisent, alors, une détection moins efficace du stockage de mucopolysaccharides.

5) Des essais préliminaires non publiés avec la glucosamine ont par ailleurs démontré autoradiographiquement que le remplacement du milieu de "pulse" standard par du tampon PBS conduit à des activités intracellulaires beaucoup plus fortes, en dépit d'une durée de "pulse" réduite à 12 ou 24 heures en raison des limites de survie des cellules, et à une disparition totale de différence significative entre mutants et normaux; ainsi, la présence d'un excès non marqué de métabolites et de précurseurs de mucopolysaccharides constitue bien un élément essentiel de notre méthode, tout en conduisant, évidemment, à une forte dilution de la radioactivité.

En outre, ainsi que nous le décrivons plus loin, le fait que la technique standard permette de mettre à jour des différences plus ou moins fortes mais toujours reproductibles entre les lignées normales et mutantes pour le sulfate, la glucosamine et la galactosamine confirme encore l'incorporation spécifique de ces précurseurs dans les mucopolysaccharides. Inversément, l'absence de telles différences pour le glucose et, en général, pour le galactose démontre l'inhibition efficace des interconversions métaboliques nuisibles à notre but.

Ainsi, notre méthode de marquage standard est certainement au moins aussi spécifique que celle de Kraemer (1968 et 1971), dont les résultats chimiques, décrits dans l'introduction, viennent renforcer nos propres conclusions indirectes, en les enrichissant de toute la valeur d'une caractérisation directe des produits radioactifs formés.

Il faut toutefois rappeler une réserve déjà mentionnée portant sur la sensibilité de notre méthode et fondée sur les faits suivants:

1) Les profils de "pulse", nettement différenciés entre mutants et normaux pour le sulfate (figure 1-A), sont confondus pour la glucosamine (figure 2-A).

2) L'évolution quantitative des différences d'accumulation entre mutants et normaux au cours du "chase" est différente pour ces deux précurseurs (figures 1-B et 2-B).

3) Les % de différences observés pour le sulfate (tableau 6) sont d'un ordre de grandeur supérieurs à ceux de la glucosamine (tableau 7).

Tout ceci indique que la mise en évidence du stockage de mucopolysaccharides est moins nette avec les sucres aminés (glucosamine et galactosamine) qu'avec le sulfate. On peut, certes, l'expliquer par le fait que ce dernier n'est pratiquement incorporé que dans les mucopolysaccharides (Fratantoni et al., 1968) mais, dans la mesure où le but principal de notre méthode est précisément d'obtenir une efficacité analogue pour les autres précurseurs, il faut admettre qu'il n'est que partiellement atteint. Cette constatation nous obligera à analyser avec quelque prudence nos résultats d'incorporation, lorsqu'aucune différence ne sera observée, pour un précurseur donné, entre une lignée mutante et les souches normales, en particulier si cela contredit d'autres données cliniques ou enzymatiques.

Remarquons, pour terminer, que les nombres de cpm/mg prot. présentent, pour une même lignée, des différences numériques importantes entre la glucosamine (tableau 7), le glucose (tableau 8) et le galactose (tableau 9). Que le glucose donne les valeurs les plus petites s'explique vrai-

semblablement par le fait qu'il est le seul substrat radioactif à être administré en présence d'un très grand excès de son homologue non marqué, d'où une dilution plus grande de la radioactivité. Que le galactose présente les chiffres les plus élevés reflète peut-être le marquage général et non nominal de ce produit (tableau 5). En effet, il est ainsi capable de fournir au métabolisme général des atomes radioactifs de qualité différente susceptibles de s'incorporer dans une grande variété de molécules. Mais nous croyons qu'il faut aussi rapprocher cette constatation d'autres résultats (Conscience, non publié) qui démontrent de façon nette que l'incorporation totale du galactose est fortement stimulée par la présence de sérum de veau embryonnaire dans le milieu, même si les périodes de "pulse" sont limitées à quelques heures. La cause de ce comportement est inconnue, pour l'instant. Il ne semble toutefois pas y avoir de relation avec le métabolisme des mucopolysaccharides puisque, pour toutes nos lignées, l'omission des étapes destinées à conserver la radioactivité de ces macromolécules au détriment de celle des autres aboutit, pour ce sucre, à des activités spécifiques beaucoup plus élevées du matériel marqué (tableau 9), qui accentuent encore le contraste quantitatif avec les valeurs correspondantes du glucose (tableau 8) et de la glucosamine (tableau 7).

ETUDE DES LIGNEES DE MUCOPOLYSACCHARIDOSES

Nous décrirons d'abord les résultats quantitatifs d'accumulation observés sur les différentes lignées de mucopolysaccharidoses avec les divers précurseurs utilisés, en nous fondant sur les données de l'analyse par scintillation et, le cas échéant, du comptage des grains autoradiographiques. Nous interpréterons ensuite ces résultats en tenant compte de la structure des mucopolysaccharides et nous discuterons ces conclusions à la lumière de résultats cliniques et enzymatiques de la bibliographie. Enfin, nous terminerons par quelques remarques consacrées aux résultats autoradiographiques, en particulier à leurs limites et à leur utilité diagnostic potentielle.

1. Résultats d'accumulation

Toutes les lignées mutantes utilisées présentent une accumulation de sulfate radioactif (figure 5), indicatrice d'un stockage de produits sulfatés. De grandes différences quantitatives sont toutefois présentes. Ainsi, les lignées issues de patients atteints du syndrome de Sanfilippo accumulent, en moyenne, nettement moins que les autres, en accord avec les observations de Kresse et al. (1971). Les résultats autoradiographiques ne recouvrent ceux de l'analyse par scintillation que pour les valeurs faibles d'augmentation. Le désaccord quantitatif pour les lignées fortement accumulatrices s'explique vraisemblablement par une action conjuguée des artefacts suivants:

1) Dans tous les cas, une forte augmentation de la densité de grains intracellulaires est accompagnée d'une élévation du nombre de grains intercellulaires. Cette augmentation du bruit de fonds est très probablement due à l'extrême solubilité dans l'eau des mucopolysaccharides (Wolfe, 1964), qui subsiste même après fixation (Zelson et Debakan, 1969); de ce fait, lors de l'immersion des lames dans l'émulsion liquide et du séchage subséquent, ces molécules ont le temps

de diffuser en partie hors des cellules, diminuant par là la densité de grains intracellulaires, la seule que nous enregistrons.

2) La multiplication du nombre de sources radioactives par cellule augmente la probabilité d'observer des grains uniques qui sont, en fait, le produit de plusieurs événements radiochimiques distincts.

3) Les populations fortement marquées présentent une certaine proportion de cellules dont la densité de grains est si forte que le comptage n'est plus possible; elles n'interviennent donc pas dans le bilan quantitatif et le diminuent d'autant.

4) La densité des autres cellules est à la limite des possibilités de comptage (150-200 grains/cellule) ce qui augmente le risque de sous-estimer le nombre réel de grains et induit l'expérimentateur à sélectionner subjectivement les cellules les moins marquées.

La plupart de nos lignées mutantes présentent également une accumulation de radioactivité consécutive au marquage avec la glucosamine (figure 6), à l'exception, possible, d'une souche de Hunter (D.S.) et, certaine, des deux souches de Sanfilippo B (G.E. et S.P.). En outre, deux lignées ne présentent que de faibles augmentations: un Hunter (H.P.) et un Sanfilippo de type A (R.K.). Dans la majorité des cas, les résultats autoradiographiques sont identiques dans les limites de l'écart-type à ceux du comptage par scintillation. Lorsque ce n'est pas le cas, un accord qualitatif est tout au moins respecté. Pour une seule lignée (G.E.), l'absence d'accumulation n'est pas confirmée par l'autoradiographie. Il faut cependant noter que le résultat autoradiographique est affecté d'un écart-type plus grand et qu'il est fondé sur un nombre plus restreint d'expériences.

Il est difficile d'obtenir des différences nettes avec la galactosamine (figure 7). Ceci s'explique, au moins partiellement, par le fait que l'addition de précurseurs froids pour limiter les interconversions métaboliques lors du marquage avec ce sucre aminé n'est pas possible en raison de sa faible

activité spécifique (voir Matériel et Techniques). On note, toutefois, que quatre lignées accumulent significativement la radioactivité issue de ce produit: deux Hunter (D.S. et H.P.), un Sanfilippo B (S.P.) et un Maroteaux-Lamy (M.). Enfin, trois souches sont nettement négatives: un Hunter (O.B.) et deux Sanfilippo A (R.K. et L.T.). Ce précurseur n'a pas été testé sur G.C. (Hurler), B.K. (Sanfilippo A) et G.E. (Sanfilippo B). Pour des raisons exposées plus loin, il n'est pas possible d'analyser quantitativement les résultats autoradiographiques de la galactosamine. Qualitativement, les faibles différences mesurées en scintillation ne se traduisent par aucune augmentation visible de densité des grains, sauf pour M.

Aucune lignée testée n'accumule le glucose de façon significative, tant selon le comptage par scintillation que selon l'autoradiographie (figure 8), bien qu'un accord quantitatif entre les deux techniques d'analyse ne soit pas toujours réalisé (voir par ex. L.T. et G.E.). Ce résultat constitue une troisième évidence qui, conjointement avec les résultats techniques discutés plus haut, permet de conclure à une absence d'incorporation de dérivés du glucose dans les mucopolysaccharides et, partant, à une inhibition efficace des interconversions métaboliques.

Enfin, aucune lignée n'accumule significativement le galactose, à l'exception de M. (figure 9). Pour cette dernière, le % de différence est si grand qu'il est difficile de conclure à autre chose qu'à un stockage de ce précurseur dans les mucopolysaccharides, idée confirmée, ainsi que nous l'avons déjà décrit, par divers essais techniques. Comme pour la galactosamine, le marquage au galactose ne peut s'analyser quantitativement par autoradiographie. Nous reviendrons plus loin sur ce point. D'un point de vue qualitatif, seul M. présente visiblement une densité de grains plus fortes, en accord avec les résultats de scintillation.

L'ensemble de ces résultats est résumé sur le tableau 10.

2. Interprétation et discussion des résultats d'accumulation

En nous fondant sur la structure des protéoglycans (tableau 2) et sur les relations théoriquement prédites dans le tableau 3, il est possible d'interpréter les résultats d'accumulation (tableau 10) en les associant avec un stockage de mucopolysaccharides particuliers. Ces interprétations peuvent alors être examinées à la lumière des données cliniques classiques et des récents développements biochimiques.

L'accumulation intratissulaire et l'excrétion urinaire de dermatan sulfate et d'héparan sulfate représentent les données classiques qui permettent de caractériser le syndrome de Hurler in vivo (McKusick et al., 1965; Constantopoulos, 1968; Dorfman et Matalon, 1969; Kaplan, 1969). Ce tableau d'accumulation et d'excrétion est en parfait accord avec la mise en évidence récente du défaut biochimique primaire, l'absence d'activité d'une α -L-iduronidase (Matalon et al., 1972; Bach et al., 1972). L'accumulation de glucosamine et de sulfate chez G.C. est compatible avec un stockage de l'héparan sulfate. Elle contredit toutefois les travaux chimiques in vitro de Matalon et Dorfman (1966 et 1969), qui ne rapportent qu'une augmentation de dermatan sulfate dans les fibroblastes de Hurler et pas de synthèse d'héparan sulfate du tout dans l'ensemble des lignées normales et mutantes qu'ils ont étudiées. Cependant, nous avons vu qu'un certain nombre de travaux récents démontrent une abondante synthèse d'héparan sulfate in vitro (Dietrich et DeOca, 1970; Bates, 1971; Kraemer, 1971), de telle sorte que ce produit est certainement présent dans nos cellules. Alors, la nature même du défaut enzymatique primaire nous oblige à admettre que ce mucopolysaccharide s'accumule dans les lignées de Hurler, conclusion que nos résultats d'incorporation confirment pleinement. In vivo, les mucopolysaccharides stockés dans les tissus des patients atteints du syndrome de Hurler ou excrétés dans leur urine sont partiellement dégradés (Knecht et al., 1967; Constantopoulos, 1968; Stone et al., 1970). In vitro, les auteurs se contredisent. Dans nos résultats, l'absence d'accumulation de galactose, indicatrice d'une dégradation normale des séquences

de liaison, confirme plutôt, en accord avec la situation in vivo, les conclusions in vitro de Fratantoni et al. (1968) et infirme celles de Matalon et Dorfman (1968), en démontrant un stockage de produits partiellement dégradés. Nos résultats ne nous permettent pas d'exclure une augmentation simultanée d'acide hyaluronique, signalée par Matalon et Dorfman (1966) et par Schafer et al. (1968), mais cette possibilité est difficile à admettre au vu de la nature du défaut enzymatique. Enfin, une accumulation de dermatan sulfate est probable, compte tenu de l'ensemble des études in vivo et in vitro, mais ne peut être prouvée ici, puisque l'incorporation de la galactosamine n'a pas été testée sur notre lignée de Hurler.

Le tableau clinique du syndrome de Hunter inclut, entre autres, une accumulation intratissulaire et une excrétion urinaire de dermatan sulfate et, en quantités plus faibles, d'héparan sulfate partiellement dégradés (McKusick et al., 1965; Constantopoulos, 1968; Dorfman et Matalon, 1969; Kaplan, 1969). Nos propres résultats montrent, in vitro également, une telle accumulation d'héparan sulfate (différence significative pour la glucosamine et le sulfate, pas de différence pour le galactose). A nouveau, cette conclusion contredit les travaux in vitro de Matalon et Dorfman (1968 et 1969), mais la même argumentation que celle développée plus haut pour le syndrome de Hurler permet de réfuter cette contradiction. De plus, deux lignées (H.P. et D.S.) accumulent également le dermatan sulfate, ainsi que le reflète l'augmentation de radioactivité consécutive au marquage avec la galactosamine. Ces deux lignées se comportent donc, sur ce point, de la façon que les travaux in vivo laissent prévoir. Leurs caractéristiques d'accumulation sont, de plus, en parfait accord avec la nature du défaut enzymatique primaire, soit l'absence d'activité d'une iduronate sulfatase (Bach G., Cantz M., Okada S., Neufeld E.F., Fed. Proc., 32, 483, 1973), puisque, nous l'avons vu, l'acide iduronique est présent à la fois sur le dermatan sulfate et sur l'héparan sulfate. Il est par contre plus difficile d'expliquer pourquoi notre troisième lignée de Hunter (O.B.) ne présente pas d'accumulation de galactosamine et, partant, ne semble pas stocker le dermatan

sulfate. Les études in vivo soulignent bien que les proportions relatives d'héparan et de dermatan sulfates varient dans l'urine des patients atteints du syndrome de Hunter (Kaplan, 1969). De plus, le tableau clinique de ce syndrome permet d'en définir deux formes, bénigne et grave (McKusick, 1972). Enfin, les études in vitro des capacités de correction des fibroblastes Hunter vis-à-vis de la métachromasie intracellulaire permettent de les diviser en deux groupes mutuellement correcteurs (Danes et Bearn, 1970). Malgré tout, il n'est pas possible actuellement de savoir si cette variabilité dans le syndrome de Hunter, constatée à des niveaux fort différents, est l'expression d'une hétérogénéité biochimique et génétique fondamentale, ou bien si elle ne correspond qu'à des variations normales de l'expression phénotypique d'un défaut unique, selon les techniques employées. A fortiori, n'est-il pas possible de mettre en relation ces évidences d'hétérogénéité avec le comportement exceptionnel d'une de nos lignées de Hunter. Il faut garder présente à l'esprit la possibilité qu'O.B. n'est peut-être qu'un accumulateur faible de dermatan sulfate que les limites de sensibilité de notre technique ne nous permettent pas de caractériser. Une accumulation simultanée d'acide hyaluronique et/ou, chez H.P. et D.S., de chondroïtine sulfates n'est pas à exclure, sur la base de nos résultats, mais reste peu probable en regard des données cliniques et enzymatiques.

L'ensemble des travaux in vivo définissent une accumulation intratissulaire et une excrétion urinaire d'héparan sulfate partiellement dégradé dans les deux types du syndrome de Sanfilippo (Wallace et al., 1966; Constantopoulos, 1968; Kaplan, 1969; Stone et al., 1970). Ce tableau de stockage est confirmé in vitro pour le type A par nos propres résultats (accumulation de sulfate et de glucosamine, absence d'accumulation de galactosamine et de galactose) et s'accorde parfaitement avec la nature de la lésion enzymatique primaire: un défaut d'activité d'une héparan sulfate sulfatase (Kresse et Neufeld, 1972). De plus cette dernière donnée exclut une accumulation simultanée d'acide hyaluronique que nos seuls

résultats ne nous permettent pas de réfuter: en effet, ce mucopolysaccharide n'est pas sulfaté.

Par contre, nos deux lignées de Sanfilippo B présentent un tableau d'accumulation de précurseurs radioactifs qui se place en opposition complète avec les données cliniques, sauf pour ce qui concerne l'état partiellement dégradé des produits de stockage suggéré par l'absence d'accumulation du galactose. En effet, l'augmentation du sulfate n'est pas accompagnée d'une différence positive significative pour la glucosamine, ce qui conduit à la conclusion que l'héparan sulfate n'est pas accumulé dans ces lignées. En outre, la seule souche également testée avec la galactosamine (S.P.) présente une accumulation significative indiquant un stockage de dermatan sulfate et, éventuellement, de chondroïtine-sulfates. Or, une telle accumulation n'a jamais été décrite *in vivo* et elle est difficilement réconciliable avec la nature du défaut enzymatique primaire, soit l'absence d'activité d'une N-acétyl- α -D-glucosaminidase (O'Brien, 1972; Von Figura et Kresse, 1972). Un seul travail, celui de Matalon et Dorfman (1969), rapporte *in vitro* un stockage de dermatan sulfate et une absence d'accumulation d'héparan sulfate dans le syndrome de Sanfilippo. Cependant, trois raisons nous incitent à la plus grande prudence dans l'utilisation des conclusions de ce travail. Tout d'abord, nous avons vu plus haut combien certains des résultats de Matalon et Dorfman (1969) sont maintenant contredits par des travaux plus récents. Ensuite, l'incompatibilité biochimique entre l'accumulation de dermatan sulfate et le défaut enzymatique primaire subsiste. Enfin, l'existence de deux types biochimiques du syndrome de Sanfilippo était inconnue en 1969 et, de ce fait, le type du patient de Matalon et Dorfman (1969) n'est pas précisé, ce qui exclut toute comparaison stricte entre leurs résultats et les nôtres. Certes, l'absence de stockage d'héparan sulfate selon notre technique peut s'expliquer simplement en objectant ses limites de sensibilité. Toutefois, une comparaison des valeurs d'accumulation pour le sulfate chez G.E. et S.P. avec celles observées chez B.K. et R.K. nous montre qu'elles sont du même ordre de grandeur, en dépit d'augmentations significatives

pour la glucosamine chez les lignées du type A. En outre, il resterait à expliquer l'accumulation de radioactivité consécutive à l'administration de galactosamine chez S.P. En bref, nos résultats démontrent une différence biochimique nette entre les types A et B du syndrome de Sanfilippo, que des arguments techniques ne permettent pas de nier de façon convaincante mais qui reste inexplicable en l'état actuel de nos connaissances.

Toutes les lignées discutées jusqu'ici ne présentent aucune accumulation significative de galactose. Nous avons interprété cette observation en concluant à une dégradation normale des séquences de liaison des polycarboxysulfates, ce qui confirme in vitro les données cliniques. Cette conclusion est parfaitement légitime si l'on se souvient des expériences cinétiques qui indiquent une frappante similitude de comportement entre le glucose et le galactose. En effet, même si notre technique standard ne nous permettait pas de mettre en évidence les faibles quantités de galactose associées aux séquences de liaison, le profil cinétique de ce sucre devrait tout au moins présenter alors une allure rappelant celle du sulfate et de la glucosamine. En outre, ce résultat indique aussi que le kératan sulfate n'est pas non plus accumulé, à nouveau en accord avec les tableaux cliniques des syndromes de Hurler, Hunter et Sanfilippo.

La lignée de Maroteaux-Lamy (M.) présente une augmentation de radioactivité à la suite d'une incubation avec tous les substrats utilisés, à l'exception du glucose. Ce dernier point permet de penser que la forte accumulation des autres précurseurs n'est pas due à une activité métabolique globale augmentée dans cette souche, sans rapport avec la mutation, mais au contraire qu'elle traduit un stockage généralisé de polycarboxysulfates. De plus, la valeur très élevée de l'augmentation pour le galactose, jointe aux évidences techniques déjà mentionnées, suggère que ce sucre est fixé sur les produits de stockage. Deux interprétations sont alors possibles. Ou bien le protéoglycan du kératan sulfate, avec la galactosamine comme sucre de liaison, s'accumule, ce qui rend compte, avec ou sans augmentation simultanée des autres protéoglycans,

du tableau de marquage de M., ou bien l'augmentation du galactose indique que les régions de liaison des polycarboxy-sulfates stockés sont encore présentes. Une augmentation de kératan sulfate paraît peu probable. Tout d'abord, une synthèse de ce mucopolysaccharide n'a jamais été démontrée avec sûreté dans les fibroblastes dérivés de la peau (Muir, 1969). Ensuite, elle contredirait les résultats de l'analyse urinaire (Maroteaux et Lamy, 1965; Kaplan, 1969; Spranger, 1970), bien que cet argument, ainsi que nous le discutons plus bas, n'est pas forcément valable. Ainsi, un stockage des protéoglycans du dermatan sulfate, de l'héparan sulfate et, éventuellement, des chondroïtine-sulfates, reste l'explication la plus évidente de ces fortes différences de marquage intracellulaire. Par ailleurs, l'absence de métachromasie au bleu de toluidine dans les fibroblastes porteurs de la mutation de Maroteaux-Lamy (Danes et al., 1970) apporte une indication, quoique très indirecte et sujette à caution, que les produits de stockage in vitro présentent un état moléculaire différent que dans les autres mucopolysaccharidoses.

Cette conclusion nous place en contradiction avec presque tous les résultats cliniques. Nous n'avons connaissance que d'un seul cas où une excrétion urinaire de dermatan sulfate et d'héparan sulfate est décrite dans le syndrome de Maroteaux-Lamy (Fallis et al., 1968). Sinon, tous les auteurs s'accordent à considérer l'excrétion du seul dermatan sulfate comme un des critères essentiels du diagnostic (McKusick et al., 1965; Kaplan, 1969; Spranger et al., 1970). Cependant, cette contradiction est peut-être plus apparente que réelle. En effet, Revell et Muir (1972) ont démontré chez le cobaye que les protéoglycans ne peuvent passer à travers la barrière rénale, au contraire des mucopolysaccharides. Ainsi, si notre interprétation est correcte, elle entraîne comme conséquence que les protéoglycans accumulés dans les divers tissus des patients atteints du syndrome de Maroteaux-Lamy ne contribuent pas à définir le tableau qualitatif type de l'excrétion urinaire. La présence exclusive de dermatan sulfate, généralement décrite, ne serait alors le reflet de l'expression du défaut de dégradation que sur les protéoglycans synthétisés au niveau

du rein. Il n'est pas possible de discuter plus avant cette possibilité car aucune étude, à notre connaissance, ne décrit la nature des protéoglycans produits par les cellules qui bordent les tubules rénales. Un autre argument dirigé plus spécialement contre la présence d'héparan sulfate dans l'accumulation généralisée postulée est le fait que les patients atteints du syndrome de Maroteaux-Lamy présentent un développement intellectuel normal, alors que le stockage de ce mucopolysaccharide est traditionnellement observé dans les types de mucopolysaccharidoses associant un retard mental à leur tableau clinique (Kaplan, 1969). Cependant, l'accumulation d'héparan sulfate n'est pas nécessairement liée de façon causale à la détérioration mentale. Une autre possibilité est que certains des défauts enzymatiques bloquant le catabolisme des protéoglycans interfèrent également avec la dégradation normale de produits cérébraux. L'augmentation simultanée de glycolipides dans divers tissus, en particulier le cerveau, des patients atteints des syndromes de Hurler et de Sanfilippo, démontrée chimiquement (Taghavy et al., 1964; Schnabel, 1961; Gonatas et Gonatas, 1965; Clausen et al., 1967; Taketomi et Yamakawa, 1967; Wherret, 1968; Debakan et Patton, 1971) et au microscope électronique (Lagunoff et al., 1962; Aleu et al., 1965), l'absence d'image de stockage neuronal chez un patient dont le tableau clinique est compatible avec le syndrome de Maroteaux-Lamy (Young et al., 1966) et l'augmentation de l'héparan sulfate, en dépit d'une intelligence normale, chez les patients atteints de la forme bénigne du syndrome de Hunter (Dorfman et Matalon, 1969) parlent en faveur de cette possibilité. En fait, la composition chimique identique de la séquence de liaison dans les trois espèces de polycarboxysulfates et la constitution similaire de leur noyau protéique (Muir, 1969) permettent d'imaginer d'emblée le type de défaut enzymatique unique (par exemple: xylolase ou protéase spécifique) qui serait susceptible d'affecter simultanément la dégradation des protéoglycans de l'héparan sulfate, du dermatan sulfate et des chondroïtine-sulfates, tout en conduisant, dans les fibroblastes, au tableau d'accumulation de précurseurs radioactifs décrit dans ce travail. Seule l'élucidation du

défaut enzymatique primaire dans le syndrome de Maroteaux-Lamy apportera une réponse à ces questions mais il est intéressant de rappeler que des mutations pleiotropiques du type postulé ici ont déjà été décrites: la gangliosidose GM1, par exemple, est caractérisée par une accumulation intratissulaire de ganglioside GM1 et d'un mucopolysaccharide voisin, sinon identique, du kératan sulfate, consécutive à un défaut d'activité d'une β -galactosidase, en raison de la présence de liaisons β -galactosides dans les deux espèces de produits de stockage (Okada et O'Brien, 1968).

3. Résultats autoradiographiques

Initialement, l'autoradiographie avait été introduite parallèlement au comptage par scintillation pour voir si, avec cette technique, un diagnostic in vitro des différents types de mucopolysaccharidoses était possible avec de très faibles quantités de cellules. Ce but n'a été que partiellement atteint, puisque seule une application potentielle au diagnostic prénatal des mucopolysaccharidoses peut être proposée. En ce qui concerne la détection sélective in vitro des différents types de ces maladies, divers facteurs limitent considérablement l'intérêt de notre technique.

Tout d'abord, il faut souligner à nouveau le caractère exceptionnel de certains de nos résultats d'accumulation, en particulier pour les syndromes de Sanfilippo B et de Maroteaux-Lamy. Il est dès lors évident qu'ils ne sauraient former la base d'un diagnostic in vitro sans être d'abord vérifiés et confirmés.

En outre, divers éléments techniques concourent à rendre difficiles les études autoradiographiques et à compliquer leur utilisation dans un but diagnostique.

Premièrement, l'extrême solubilité dans l'eau des mucopolysaccharides fixés (Zelson et Debakan, 1969) ou non (Wolfe, 1964) rend difficile l'application des méthodes standards d'autoradiographie qui toutes impliquent le passage dans des milieux aqueux (Rogers, 1969). Or, ceci amène une diffusion extracellulaire des produits de stockage qui diminue considé-

ablement la qualité des préparations en provoquant une forte augmentation du bruit de fonds et, nous l'avons vu, un dosage moins fidèle de la radioactivité, lors du comptage des grains sur les cellules fortement marquées. Ce phénomène, clairement visible sur les photographies des planches 1-3, est bien dû à une diffusion des produits de stockage. En effet, la chimio-graphie et le bruit de fonds spontané sont, dans nos conditions, négligeables, ainsi que le démontre l'autoradiographie de cellules déficientes en galactose-kinase avec le galactose- $[^3\text{H}]$ (planche 3c). De plus, cette augmentation du bruit de fonds est toujours parallèle à une augmentation de la radioactivité intracellulaire dans les différentes lignées. Enfin, les % de différence autoradiographiques plus faibles que ceux du comptage par scintillation pour les lignées fortement accumulatrices de sulfate (figure 5) ne sont pas explicables par un phénomène de "latent image fading", inexistant avec notre matériel. Il est possible que l'emploi des techniques spéciales développées pour l'autoradiographie des molécules marquées hydrosolubles (Rogers, 1969) contribue à diminuer cet effet. Elles sont toutefois compliquées et délicates.

Un autre élément défavorable nous est imposé par la structure radiochimique des produits marqués utilisés. On sait que le tritium, de par sa faible énergie d'émission β est remarquablement bien adapté à l'autoradiographie. Malheureusement, seule la galactosamine- $[1-^{14}\text{C}]$ est disponible commercialement et le ^{35}S est indispensable au marquage du sulfate. Or, ces deux isotopes présentent une énergie d'émission β environ 10 fois plus grande que celle du ^3H . Cette propriété réduit encore, dans ces deux cas, le pouvoir de résolution de l'autoradiographie, déjà affecté par la solubilité dans l'eau des produits marqués (comparer par exemple les planches 1 et 2).

Un dernier élément défavorable en général réside dans la mauvaise qualité histologique des préparations que l'on obtient par notre méthode standard. Elle prend son origine dans trois étapes techniques. Tout d'abord, la pratique de trypsiniser les cellules avant l'autoradiographie pour les laisser se fixer, à l'état dispersé, sur un couvre-objet offre l'avantage de livrer des objets qui se détachent mieux de leur arrière-plan. Elle entraîne en revanche des images de cellules qui ne

présentent plus l'aspect fibroblastique typique. A lui seul, cet inconvénient ne serait qu'esthétique si deux autres éléments ne venaient l'aggraver. La démonstration d'un rôle essentiel de l'extraction à l'éthanol pour les sucres précurseurs nous a incités à transposer cette étape dans l'analyse autoradiographique en plongeant les couvres-objet non fixés dans des bains d'éthanol à 80 % v/v bouillant (voir Matériel et Techniques). Ce procédé est certainement très loin de constituer une méthode de fixation idéale. Il est responsable de l'aspect tourmenté des contours cellulaires et de la nature peu homogène du matériel cytoplasmique. Enfin, la coloration à travers la forte épaisseur d'émulsion requise pour le ^{35}S et le ^{14}C , afin d'obtenir un résultat dans des délais relativement courts, se fait mal et conduit, pour ces deux isotopes surtout, à des cellules dont les contours restent souvent assez mal définis. Cet inconvénient est particulièrement gênant lors du comptage des grains.

Tous ces éléments affectent aussi bien la sûreté d'un constat purement qualitatif de l'accumulation que l'aisance et la fidélité du comptage des grains, requis lorsque les valeurs d'augmentation sont faibles, comme pour les sucres.

Cependant, ces défauts de l'autoradiographie ne jouent plus qu'un rôle réduit, si les valeurs d'accumulation deviennent très nettes. Or ceci est précisément le cas pour le sulfate. Il n'est donc pas étonnant que, pour ce produit seulement, l'accumulation de radioactivité soit directement constatable, sur les préparations autoradiographiques, sans qu'il soit nécessaire de recourir au comptage des grains. Certes, l'analyse quantitative démontre qu'à partir d'un certain seuil situé vers 300 % environ (figure 5), la densité de grains intracellulaires n'est plus un reflet fidèle des dimensions réelles de l'accumulation. Mais, dans la mesure où la valeur absolue de cette dernière ne joue pas de rôle pour le diagnostic, cette limite technique peut être ignorée. Nous avons essayé de traduire l'impression d'ensemble que donnent des préparations normales et mutantes marquées au sulfate sur la planche 1. Le résultat photographique est moins convainquant que l'examen direct au microscope, mais il est évident, néan-

moins, que les trois lignées mutantes choisies (G.C., O.B. et B.K.) présentent toutes des densités de grains visiblement plus fortes que les cellules normales.

Ainsi, en dépit de ses limites, l'autoradiographie permet de distinguer les cellules accumulatrices de sulfate des autres, c'est-à-dire de poser le diagnostic in vitro de mucopolysaccharidose, aussi sûrement que le dosage par scintillation ou les études cinétiques de Fratanoni et al. (1968). Or, ce résultat, qui ne nécessite que peu de cellules, peut s'obtenir très rapidement. Tout d'abord, il est parfaitement possible de réduire l'échelle de nos expériences pour appliquer notre méthode à des microcultures dont l'établissement demande moins de temps. Ensuite, les résultats de la planche 1 ont nécessité, avec 3 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$, un temps d'exposition autoradiographique d'une semaine. Ce délai pourrait sans autre être encore réduit, soit par une augmentation de la dose radioactive (les cellules sont à même de supporter jusqu'à 7 $\mu\text{Ci/ml}$ de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$: Fratanoni et al., 1968), soit en se contentant d'une densité de grains plus faible. Enfin, l'analyse des préparations est immédiate, puisqu'aucun comptage n'est nécessaire. De toute façon, même si une plus grande sûreté de diagnostic est désirée, ce qui pourrait être parfois le cas avec les cultures de Sanfilippo à cause de leur accumulation plus faible, nos propres expériences ont démontré qu'un comptage de 10-20 cellules suffit à assurer un résultat statistiquement significatif. Ceci ne requiert pas plus d'une heure de travail. En bref, à partir du moment où les cellules ont reçu la radioactivité, un maximum de 9-13 jours nous sépare du résultat, soit: 3 jours de "pulse", 1 jour de "chase", 1 jour pour le séchage des préparations, 3-7 jours d'exposition et 1 jour pour le développement, le séchage et l'analyse des autoradiographies.

L'intérêt d'une telle méthode est évidemment réduit pour le diagnostic habituel. En effet, aucune limite sérieuse n'est en général imposée, ni quant au délai de l'analyse, ni quant à la quantité de cellules disponibles. Il sera toujours préférable, alors, d'utiliser la technique des cultures mixtes (Neufeld et Cantz, 1971), qui présente l'avantage décisif de

fournir une caractérisation du type de la mucopolysaccharidose. En revanche, aucune méthode, à ce jour, ne permet de garantir un diagnostic prénatal de ces maladies. Personne n'a osé fonder une telle détection sur la seule métachromasie au bleu de toluidine des cellules mutantes (Danes et Bearn, 1965) à cause du peu de sûreté de cette technique histologique (Milunsky et Littlefield, 1969; Taysi et al., 1969). L'étude cinétique de l'incorporation du sulfate radioactif (Fratantoni et al., 1968) a bien permis de démontrer que les cultures de cellules amniotiques dérivées de foetus atteints de mucopolysaccharidoses présentent le même profil anormal que les fibroblastes adultes, mais un délai de 10 semaines est requis pour rassembler le matériel nécessaire à cette analyse (Fratantoni et al., 1969). Le dosage chimique des mucopolysaccharides dans le liquide amniotique lui-même (Matalon et al., 1970) présente de trop grandes variations pendant la grossesse pour permettre une détection sûre de concentrations anormalement élevées (Danes et al., 1970; Brock et al., 1971). Enfin, bien que les récentes données enzymatiques semblent s'appliquer aux cellules amniotiques également, puisque les cultures normales présentent des niveaux normaux d'activité (O'Brien, 1972), le délai nécessaire à une telle analyse reste, pour l'instant, de 5 semaines au minimum (Bach et al., 1972) et de plus, le syndrome de Maroteaux-Lamy n'est pas caractérisé à ce niveau. Par comparaison, notre méthode offre, en principe, la possibilité de poser le diagnostic dans un délai variant entre 2 et 5 semaines, selon le temps nécessaire à l'établissement de quelques clones cellulaires auxquels le sulfate radioactif peut être directement administré. En outre, elle ne requiert qu'un minimum d'équipement que tout laboratoire de cytologie familiarisé avec la culture de tissus possède. Enfin, elle n'offre aucune difficulté technique particulière. En résumé, la technique standard développée dans cette étude ne présente que peu d'intérêt, au stade actuel, pour la définition in vitro des différents types de mucopolysaccharidoses dans un but diagnostique, mais elle offre d'intéressantes possibilités pour la détection prénatale de ces entités.

Un autre aspect intéressant des préparations autoradiographiques réside dans la possibilité, unique à cette technique, d'examiner le phénotype de chaque cellule. Il est ainsi permis d'étudier la répartition intracellulaire du marquage, d'une part, et le degré d'homogénéité de la culture, d'autre part. Certes, nous avons orienté notre technique dans le sens d'une obtention rapide de grains bien visibles, d'où l'emploi de couches assez épaisses d'une émulsion très sensible à gros grains (Ilford G5). On facilite ainsi l'analyse quantitative, mais au détriment de la résolution. Toutefois, sur les préparations de cellules mutantes marquées au tritium avec la glucosamine- $[6-^3\text{H}]$, cette dernière reste suffisante pour tirer quelques conclusions des données de la planche 2. On constate tout d'abord que les noyaux sont relativement libres de grains, ce qui indique, à un niveau certes très grossier, qu'une certaine spécificité de marquage a été réalisée. Par ailleurs, la densité de grains cytoplasmiques n'est pas homogène. Elle est plus forte dans une zone périnucléaire fortement vacuolisée que dans les régions plus homogènes du cytoplasme. Notre niveau de résolution et la mauvaise qualité histologique de ces préparations rendent illusoire toute identification précise de cette zone au marquage si intense. Il est toutefois intéressant de mettre en parallèle son contenu élevé en vacuoles et le fait que les produits de stockage des mucopolysaccharidoses s'accumulent avant tout dans des lysosomes distendus (VanHoof et Hers, 1964). Les cellules présentant une image de localisation aussi nette que celles de la planche 2 ne se rencontrent pas dans les lignées normales et ne constituent que le 10-20 % de la population cellulaire totale des souches mutantes. Elles sont en outre de plus grande taille que les autres. C'est parmi elles que l'on trouve des exemples de ces cellules si fortement marquées qu'elles en deviennent incomptables et constituent ainsi, nous l'avons vu, un facteur diminuant la fidélité du comptage des grains. Dans la mesure où la qualité des préparations permet une telle comparaison, elles ne sont pas sans rappeler les cellules dites "gargoyles" que Danes et Bearn (1965) observent dans les cultures de mucopolysaccharidoses. L'origine de ces cellules est inconnue, mais il est intéressant de noter que l'on retrouve au niveau autoradiographique un élé-

ment historiquement bien défini.

L'examen des préparations autoradiographiques révèle aussi un phénomène d'hétérogénéité du marquage très frappant avec le galactose et, à un degré moindre, la galactosamine. Alors que la distribution des données individuelles dans le cas du sulfate, du glucose et de la glucosamine est compatible avec une distribution normale, n'importe quel échantillon de cellules normales ou mutantes marquées au galactose présente toute une gamme de densités de grains allant des cellules pratiquement non marquées jusqu'à celles qui sont presque noires de radioactivité, sans qu'une quelconque de ces classes domine particulièrement. Ce phénomène est illustré sur la planche 3 (a et b). Par ailleurs, nous avons déjà mentionné le fait que le galactose voit son incorporation intracellulaire stimulée en présence de sérum de veau embryonnaire. Cette stimulation est, en fait, paradoxale puisqu'elle va à l'encontre du simple effet de dilution isotopique observé, par exemple, avec la glucosamine, lorsque la concentration de métabolites organiques dans le milieu de marquage augmente. L'autoradiographie complète ici nos observations en montrant que le degré d'hétérogénéité de la population est d'autant plus grand que l'incorporation globale est plus élevée. La cause de ces deux phénomènes, dont l'interdépendance n'est d'ailleurs pas prouvée, reste inconnue. Un certain nombre d'évidences indirectes, en particulier l'existence de telles images hétérogènes chez les cellules normales aussi bien que mutantes, nous conduisent à penser que ce comportement n'est pas en relation avec le stockage des mucopolysaccharides.

On voit donc l'intérêt de l'autoradiographie pour l'étude d'un certain nombre de données qualitatives que l'analyse par scintillation est incapable de mettre en évidence. Il est par contre évident que cette dernière technique reste mieux adaptée à une analyse globale et quantitative de toute une population cellulaire. Dans cette étude, les deux approches se complètent de façon intéressante.

CONCLUSION

Les résultats de ce travail peuvent être envisagés sous quatre angles: utilité diagnostic appliquée, intérêt méthodologique général, contribution à notre connaissance du métabolisme normal et altéré in vitro des mucopolysaccharides et aspect cellulaire du marquage. Nous allons, dans cette conclusion, résumer rapidement et discuter de façon générale l'apport de notre étude à ces quatre aspects.

Sur le plan diagnostic appliqué, nous avons démontré, tout en le regrettant, que notre approche indirecte de marquage des mucopolysaccharides ne présente pas, dans son stade actuel de développement, une sûreté suffisante pour permettre une caractérisation digne de confiance des différents types de mucopolysaccharidoses. Nous ne reviendrons pas ici sur les arguments purement techniques (difficulté de l'autoradiographie, nécessité de déterminations multiples, etc...) qui constituent un aspect de ce problème, car nous pensons que certaines améliorations pourraient être apportées ici. Par exemple, il devrait être possible d'augmenter l'efficacité du traitement chimique du matériel marqué en remplaçant ou en complétant l'extraction à l'éthanol par quelque autre processus de précipitation ou d'extraction plus ou moins sélectif des mucopolysaccharides (traitement au chlorure de cétyl-pyrimidium, entre autres). D'autre part, le développement d'une méthode permettant de mieux fixer les mucopolysaccharides en vue de l'autoradiographie ne devrait pas poser de problèmes insolubles. Il est évident que tous les autres aspects de notre étude n'auraient qu'à gagner de telles améliorations techniques. Toutefois, il n'en reste pas moins que, même si les difficultés techniques étaient résolues, le caractère inattendu de certains de nos résultats empêcherait encore leur utilisation diagnostic, avant que ces données ne soient vérifiées et, si possible, expliquées.

Par contre, notre travail démontre qu'un diagnostic atypique des mucopolysaccharidoses est possible par l'examen autoradiographique du marquage avec le sulfate radioactif.

Cette méthode présente peu de différences de principe avec les études cinétiques de l'incorporation du sulfate, mais elle introduit deux avantages expérimentaux, à nos yeux décisifs. Premièrement, une grande rapidité d'exécution, puisque très peu de matériel est requis pour l'analyse et que le temps d'exposition autoradiographique peut être ramené à 2-3 jours avec des doses radioactives convenablement choisies. Secondement, en combinant plusieurs étapes techniques, dont le rôle utile pour une diminution de la radioactivité non spécifique est démontré, elle permet de faire apparaître des différences nettes entre mutants et normaux avec une détermination unique, même pour les cultures qui n'accumulent que faiblement le sulfate (par exemple, les cas de Sanfilippo). Il est certes nécessaire d'effectuer quelques essais préliminaires additionnels avant que de passer à l'utilisation de cette technique, mais, si les perspectives encourageantes entrevues ici se confirmaient, on aurait mis au point, pour la première fois, une méthode sûre de détection *in utero* des mucopolysaccharidoses dont la rapidité d'exécution est compatible avec les impératifs gynécologiques inhérents au diagnostic prénatal.

Sur le plan méthodologique, nous avons confirmé qu'il était possible de marquer relativement sélectivement les divers types de mucopolysaccharides en administrant aux fibroblastes cultivés des précurseurs radioactifs de ces macromolécules dans des conditions telles que les interconversions métaboliques sont fortement limitées et que les produits radioactifs formés autres que les mucopolysaccharides sont efficacement dégradés. Divers essais techniques, de même que les images de localisation intracellulaire du marquage autoradiographique, permettent de conclure au succès de cette approche. Ils précisent en outre que parmi toutes les étapes techniques, la présence du mélange de précurseurs nom marqués, le "chase" en milieu carencé et l'extraction à l'éthanol représentent les éléments essentiels pour assurer cette sélectivité. Toutefois, cette dernière n'est pas absolue, ainsi qu'en témoigne la mise en évidence de différences d'incorporation plus faibles pour les sucres précurseurs que

pour le sulfate. Une certaine réserve est donc ici de mise. Si cette technique de marquage était appelée à être fréquemment utilisée en d'autres occasions, il serait évidemment nécessaire de la vérifier une fois pour toutes directement, c'est-à-dire de démontrer chimiquement que la radioactivité issue des divers précurseurs se trouve bien fixée sur les espèces de mucopolysaccharides que la structure de ces derniers nous a permis de prédire. Il reste néanmoins clair que les principes théoriques discutés dans cette étude présentent un intérêt méthodologique général pour l'étude des thésaurismoses et l'avantage décisif de déboucher sur des méthodes qui ne font plus appel à des procédés chimiques de séparation et d'identification, toujours difficiles à appliquer sur les faibles quantités de produits livrées par la culture in vitro.

Sur le plan biochimique, l'intérêt de ce travail est double. Il corrige, d'une part, les conclusions de travaux plus anciens qui ne se trouvaient plus en bon accord avec les récentes données enzymatiques. Ainsi, il démontre une accumulation d'héparan sulfate dans les lignées de Hurler, Hunter et Sanfilippo A, précédemment non détectée, et qui apparaît comme une conséquence nécessaire et logique des défauts enzymatiques primaires nouvellement identifiés. Il présente, d'autre part, trois conclusions inattendues. Tout d'abord, l'apparente absence d'accumulation de dermatan sulfate dans une de nos lignées de Hunter, simple artefact technique peut-être, ou alors démonstration d'un niveau d'hétérogénéité jusqu'ici non soupçonné dans ce syndrome. Ensuite, l'absence d'accumulation d'héparan sulfate, remplacée, semble-t-il, par un stockage de dermatan sulfate, dans les lignées de Sanfilippo B, phénomène inexplicable sur la base des connaissances enzymatiques actuelles, mais intéressant sur le plan biochimique. Enfin, l'accumulation simultanée des protéoglycans de l'héparan sulfate, du dermatan sulfate et des chondroïtine sulfates dans la lignée de Maroteaux-Lamy, qui suggère un défaut enzymatique primaire affectant la dégradation du noyau protéique ou de la séquence de liaison commune à tous ces polycarboxysulfates.

Ces résultats soulèvent un certain nombre de questions très importantes. Ils démontrent tout d'abord que les tableaux d'accumulation décrits in vivo ne sont pas extrapolables, dans tous les cas, à la situation in vitro. Cette conclusion prévisible souligne la situation particulière du fibroblaste cultivé. Nous croyons cependant que les différences observées ne sont pas en relation avec les conditions particulières de la culture de tissus, mais bien plutôt avec le degré de différenciation fonctionnelle du fibroblaste, par opposition au foie, au rein ou au système nerveux. Cela revient à dire que, à notre avis, les tableaux d'accumulation décrits ici correspondent aux caractéristiques de stockage des fibroblastes de peau in vivo. D'autre part, les différences de stockage notées entre différents patients atteints du même syndrome (voir en particulier les trois patients de Hunter) suggèrent que l'on a chaque fois affaire à des mutations différentes sur le même gène, qui nuancent quantitativement et parfois aussi qualitativement, l'expression phénotypique du défaut primaire et constituent, de ce fait, un niveau très fondamental d'hétérogénéité génétique. Cette conclusion n'est pas inattendue, puisque ces patients ne sont pas apparentés et résultent par conséquent de la combinaison à l'état homozygote de mutations apparues dans des lignées génétiques distinctes. Enfin, l'hypothèse inédite que nous avons émise pour le syndrome de Maroteaux-Lamy permet, si elle est juste, de mieux définir le processus normal de dégradation des mucopolysaccharides. L'attaque hydrolytique de ces molécules se ferait d'abord sur le noyau protéique et la séquence de liaison, étape déficiente chez Maroteaux-Lamy, pour se continuer par l'action alternative d'exohydrolases spécifiques du résidu terminal réducteur des chaînes latérales. La nature du défaut enzymatique primaire dans les autres types de mucopolysaccharidoses, de même que le stockage, dans ces cas, de produits dépourvus de région de liaison apportent leur appui à ce modèle. En résumé, il n'y a guère que pour le syndrome de Sanfilippo B que ni la génétique, ni la biochimie ne nous fournissent, en l'état actuel de nos connaissances, une hypothèse satisfaisante pour expliquer l'accumulation de dermatan sulfate.

L'examen autoradiographique du marquage intracellulaire est intéressant à deux titres. Il met en évidence un certain degré de localisation précise de la radioactivité et démontre une très grande hétérogénéité intercellulaire dans l'intensité de l'incorporation du galactose et de la galactosamine. La qualité de nos préparations et l'attention moins soutenue que nous avons accordée aux études autoradiographiques ne nous permettent pas d'émettre des hypothèses précises ou de tirer des conclusions définitives pour expliquer ces deux faits. Leur principal mérite est d'illustrer l'avantage décisif de l'autoradiographie par rapport au comptage par scintillation, c'est-à-dire la possibilité d'examiner au niveau de la cellule individuelle la façon dont les cellules normales et mutantes réagissent vis-à-vis du substrat radioactif administré dans le milieu. Les quelques données obtenues ici, laissent entrevoir d'autres applications intéressantes de l'autoradiographie. On devrait par exemple être en mesure, par cette technique, de mettre en évidence des situations où la correction *in vitro* de deux lignées cellulaires mutantes ne se fait pas de façon réciproque. Dans ce cas, en effet, la culture mixte devrait présenter une mosaïque de cellules normalisées et, partant, peu marquées, et de cellules non corrigées, abondamment marquées. L'intérêt théorique de telles observations est évident.

L'approche originale d'étude des mucopolysaccharidoses décrite dans ce travail présente donc tout un éventail d'applications importantes et un certain nombre de résultats utiles à une meilleure compréhension de ces maladies et du métabolisme normal des mucopolysaccharides. Certes, il ne faut pas sous-estimer les aspects négatifs: la nécessité de répéter ces expériences et de les étendre à d'autres lignées pour se persuader que les résultats obtenus ne dépendent pas des cultures utilisées, certaines difficultés techniques en particulier avec l'autoradiographie, etc... Nous croyons cependant que l'intérêt de ces études devrait suffire à inspirer d'autres recherches dans cette direction.

AUTEURS CITES

- Aleu F.P., Terry R.D., Zellweger H., "Electron microscopy of two cerebral biopsies in gargoylism.", J. Neuropathol. exptl. Neurol., 24, 304-317, (1965).
- Bach G., Friedman R., Weissmann B., Neufeld E.F., "The defect in the Hurler and Scheie syndromes: Deficiency of α -L-iduronidase.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 69, 2048-2051, (1972).
- Bartsocas C.S., Moser H.W., "In vivo kinetics of polysaccharides in the Hurler and Scheie syndromes.", Pediat. Res., 4, 451, (1970).
- Bates C.J., Levene C.I., "The synthesis of sulfated glycosaminoglycans by the mouse fibroblast line 3T6.", Biochim. Biophys. Acta, 237, 214-226, (1971).
- Brock D.J.H., Gordon H., Seligman S., Lobo E. de H., "Antenatal detection of Hurler's syndrome.", Lancet, ii, 1324-1325, (1971).
- Castor C.W., Prince R.K., Dorstewitz E.L., "Characteristics of human fibroblasts cultivated in vitro from different anatomical sites.", Lab. Invest., 11, 703-713, (1962).
- Clausen J., Dyggve H.V., Melchior J.C., Lou H.O.C., "Chemical studies in gargoylism.", Arch. Dis. Childh., 42, 62-69, (1967).
- Constantopoulos G., "Hunter-Hurler syndrome: Gel filtration and dialysis of urinary acid mucopolysaccharides.", Nature, 220, 583-585, (1968).
- Danes B.S., "Corneal clouding in the genetic mucopolysaccharidoses: A cell culture study.", Clin. Genet., 4, 1-7, (1973).
- Danes B.S., Bearn A.G., "Hurler's syndrome: demonstration of an inherited disorder of connective tissue in cell culture.", Science, 149, 987-989, (1965).

- Danes B.S., Bearn A.G., "Correction of cellular metachromasia in cultured fibroblasts in several inherited mucopolysaccharidoses.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 67, 357-364, (1970).
- Danes B.S., Scott J.E., Bearn A.G., "Further studies on metachromasia in cultured human fibroblasts.", J. Exptl. Med., 132, 765-774, (1970).
- Danes B.S., Queenan J.T., Gadow E.C., Cederqvist L.L., "Antenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis.", Lancet, i, 946-947, (1970).
- Debakan A.S., Patton V.M., "Hurler's and Sanfilippo's variants of mucopolysaccharidosis.", Arch. Pathol., 91, 434-443, (1971).
- Dietrich C.P., DeOca H.M., "Production of heparin-related mucopolysaccharides by mammalian cells in culture.", Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 134, 955-962, (1970).
- Dodion J., Bollaert A., Toppet M., Cremer N., Viart R., DeMarneffe R., Loeb H., "Maladie de Morquio ou mucopolysaccharidose type IV.", Acta Paediat. Belg., 23, 35-49, (1969).
- Dorfman A., Matalon R., "The Hurler and Hunter syndromes.", Am. J. Med., 47, 691-707, (1969).
- Fallis N., Barnes F.L., DiFerrante N., "A case of polydystrophic dwarfism with urinary excretion of dermatan sulfate and heparan sulfate.", J. Clin. Endocrinol., 28, 26-33, (1968).
- Fratantoni J.C., Hall C.W., Neufeld E.F., "The defect in Hurler's and Hunter's syndromes: Faulty degradation of mucopolysaccharides.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 60, 699-706, (1968).
- Fratantoni J.C., Hall C.W., Neufeld E.F., "Hurler and Hunter syndromes: Mutual correction of the defect in cultured fibroblasts.", Science, 162, 570-572, (1968).
- Fratantoni J.C., Neufeld E.F., Uhlendorf B.W., Jacobson B.C., "Intrauterine diagnosis of the Hurler and Hunter syndromes.", New England J. Med., 280, 686-688, (1969).

- Gaines M.L., "Synthesis of acid mucopolysaccharides and collagen in tissue cultures of fibroblasts.", Bull. John Hopkins Hosp., 106, 195-204, (1960).
- Goidanich I.F., Lenzi L., "Morquio-Ullrich disease.", J. Bone Joint Surg., 46A, 734-746, (1964).
- Gonatas N.K., Gonatas J., "Ultrastructural and biochemical observations on a case of systemic late infantile lipidosis and its relationship to Tay-Sachs disease and gargoylism.", J. Neuropathol. Exptl. Neurol., 24, 318-340, (1965).
- Good N.E., Winget D.G., Winter W., Connolly T.N., Izawa S., Singh R., "Hydrogen ion buffers for biological research.", Biochem., 5, 467-477, (1966).
- Grossfeld H., Meyer K., Godman G., "Differentiation of fibroblasts in tissue culture, as determined by mucopolysaccharide production.", Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 88, 31-35, (1955).
- Grossfeld H., Meyer K., Godman G., Linker A., "Mucopolysaccharides produced in tissue culture.", J. Biochem. Biophys. Cytol., 3, 391-396, (1957).
- Hamerman D., Todaro G.J., Green H., "The production of hyaluronate by spontaneously established cell lines and viral transformed lines of fibroblastic origin.", Biochim. Biophys. Acta, 101, 343-351, (1965).
- Herd J.K., "Detection of radioactive acid mucopolysaccharides on electrophoresis membranes.", Anal. Biochem., 48, 103-111, (1972).
- Horton W.A., Schimke R.N., "A new mucopolysaccharidosis.", J. Pediat., 77, 252-258, (1970).
- Hunter C., "A rare disease in two brothers.", Proc. Roy. Soc. Med., 10, 104, (1917).

- Hurler G., "Ueber einen Typ multipler Abartungen, vorwiegend am Skelettsystem.", Zschr. Kinderhk., 24, 220, (1919).
- Jeanloz R.W., "The nomenclature of mucopolysaccharides.", Arthritis Rheumat., 3, 233-237, (1960).
- Kaplan D., "Classification of the mucopolysaccharidoses based on the pattern of mucopolysacchariduria.", Am. J. Med., 47, 721-729, (1969).
- Knecht J., Cifonelli J.A., Dorfman A., "Structural studies on heparitin sulfate of normal and Hurler tissues.", J. Biol. Chem., 242, 4652-4661, (1967).
- Kornfeld S., Ginsburgh V., "The metabolism of glucosamine by tissue culture cells.", Exptl. Cell Res., 41, 592-600, (1966).
- Kraemer P.M., "Production of heparin related glycosaminoglycans by an established mammalian cell line.", J. Cell. Physiol., 71, 109-120, (1968).
- Kraemer P.M., "Heparan sulfates of cultured cells. I. Membrane-associated and cell-sap species in Chinese hamster cells.", Biochem., 10, 1437-1445, (1971).
- Kraemer P.M., "Heparan sulfates of cultured cells. II. Acid-soluble and -precipitable species of different cell lines.", Biochem., 10, 1445-1451, (1971).
- Kresse H., Wiesmann U., Cantz M., Hall C.W., Neufeld E.F., "Biochemical heterogeneity of the Sanfilippo syndrome: Preliminary characterization of two deficient factors.", Biochem. Biophys. Res. Com., 42, 892-898, (1971).
- Kresse H., Neufeld E.F., "The Sanfilippo A corrective factor.", J. Biol. Chem., 247, 2164-2170, (1972).
- Lagunoff D., Ross R., Benditt E.P., "Histochemical and electron microscopic study in a case of Hurler's disease.", Am. J. Pathol., 41, 273-286, (1962).

- Langer L.O., Kronenberg R.S., Gorlin R.J., "Acute simulating Hurler syndrome of unusual longevity, without abnormal mucopolysacchariduria.", Am. J. Med., 40, 448-457, (1966).
- Lie S.O., McKusick V.A., Neufeld E.F., "Simulation of genetic mucopolysaccharidoses in normal human fibroblasts by alteration of pH of the medium.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 69, 2361-2363, (1972).
- Lie S.O., Schofield B.H., Taylor H.H., Doty S.B., "Structure and function of the lysosomes of human fibroblasts in culture: Dependence on medium pH.", Pediat. Res., 7, 13-19, (1973).
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent.", J. Biol. Chem., 193, 265-275, (1951).
- Magrini U., Fraccaro M., Tiepolo L., Scappaticci S., Lenzi L., Perona G.P., "Mucopolysaccharidoses: autoradiographic study of sulfate-³⁵S uptake by cultured fibroblasts.", Ann. Hum. Genet. London, 31, 231-236, (1967).
- Maroteaux P., Lamy M., "Hurler disease, Morquio's disease and related mucopolysaccharidoses.", J. Pediat., 67, 312-323, (1965).
- Maroteaux P., Levêque B., Marie J., Lamy M., "Une nouvelle dysostose avec élimination urinaire de chondroïtine-sulfate B.", Presse méd., 71, 1849-1852, (1963).
- Matalon R., Dorfman A., "Hurler's syndrome: Biosynthesis of acid mucopolysaccharides in tissue culture.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 56, 1310-1316, (1966).
- Matalon R., Dorfman A., "Intracellular mucopolysaccharides of fibroblasts cultured from Hurler's syndrome.", Fed. Proc., 27, 719, (1968).

- Matalon R., Dorfman A., "Acid mucopolysaccharides in cultured human fibroblasts.", Lancet, ii, 838-841, (1969).
- Matalon R., Dorfman A., "Hurler's syndrome, an α -L-iduronidase deficiency.", Biochem. Biophys. Res. Com., 47, 959-964, (1972).
- Matalon R., Dorfman A., Nadler H.L., Jacobson C.B., "A chemical method for the antenatal diagnosis of mucopolysaccharidoses.", Lancet, i, 83, (1970).
- McKusick V.A., "The nosology of the mucopolysaccharidoses.", Am. J. Med., 47, 730-747, (1969).
- McKusick V.A., Howell R.R., Hussels I.E., Neufeld E.F., Stevenson R.E., "Allelism, non-allelism and genetic compounds among the mucopolysaccharidoses.", Lancet, i, 993-996, (1972).
- McKusick V.A., Kaplan D., Wise D., Hanley W.B., Suddarth S.B., Sevvick M.E., Maumanee A.E., "The genetic mucopolysaccharidoses.", Medicine, 44, 445-483, (1965).
- Meyer K., "Biochemistry and biology of mucopolysaccharides.", Am. J. Med., 47, 664-672, (1969).
- Meyer K., Hoffman P., "Hurler's syndrome.", Arthritis Rheumat., 4, 552-560, (1961).
- Milunsky A., Littlefield J.W., "Diagnostic limitations of metaphase chromasias.", New England J. Med., 281, 1128-1129, (1969).
- Morquio L., "Sur une forme de dystrophie osseuse familiale.", Bull. Soc. Pédiat. Paris, 27, 145, (1929).
- Muir H., "The structure and metabolism of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) and the problem of the mucopolysaccharidoses.", Am. J. Med., 47, 673-690, (1969).
- Neufeld E.F., Cantz M.J., "Corrective factors for inborn errors of mucopolysaccharide metabolism.", Ann. N.Y. Acad. Sci., 179, 580-587, (1971).

- O'Brien J., (1969): communication personnelle à McKusick (1969).
- O'Brien J., "Sanfilippo syndrome: profound deficiency of alpha-acétylglucosaminidase activity in organs and skin fibroblasts from type B patients.", Proc. Natl. Acad. Sci. US, 69, 1720-1722, (1972).
- Okada S., O'Brien J. S., "Generalized gangliosidosis: β -galactosidase deficiency.", Science, 160, 1002-1004, (1968).
- Paul J., Cell and Tissue Culture, E. & S. Livingstone, Edinburgh and London, 1970.
- Philippart M., Sugarman G.I., "Chondroitin-4-sulfate mucopolysaccharidosis. - A new variant of Hurler syndrome.", Lancet, ii, 854, (1969).
- Rampini S., "Das Sanfilippo-Syndrome (polydystrophe Oligophrenie, HS-Mukopolysaccharidose).", Helv. Paediat. Acta, 24, 55-91, (1969).
- Rampini S., "Der Spät-Hurler. Ullrich-Scheie-Syndrom, Mukopolysaccharidose V.", Schweiz. Med. Wschr., 99, 1769-1778, (1969).
- Revell P.A., Muir H., "The excretion and degradation of chondroitin-4-sulfate administered to Guinea pigs as free chondroitin sulfate and as proteoglycans.", Biochem. J., 130, 597-606, (1972).
- Rogers A.W., Techniques of Autoradiography, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam London New York, 1969.
- Sanfilippo S.J., Yunis J., Worthen H.C., "An unusual storage disease ressembling the Hurler-Hunter syndrome.", Am. J. Dis. Child., 104, 553, (1962).
- Schafer I.A., Sullivan J.C., Svejcar J., Kofoed J., Robertson B. van W., "Study of the Hurler syndrome using cell culture: Definition of the biochemical phenotype and the effect of ascorbic acid on the mutant cell.", J. Clin. Invest., 47, 321-328, (1968).

- Scheie H.G., Hambrick G.N., Barness L.A., "A newly recognized forme fruste of Hurler's disease (gargoylism).", Am. J. Ophthalmol., 53, 753-769, (1962).
- Schnabel R., "Histochemische und biochemische Untersuchungen beim Gargoylismus (Pfaundler-Hurler Syndrom).", Virchows Arch. Pathol. Anat., 334, 379-398, (1961).
- Schuster W., Spranger J., "Chondroitin-4-Sulfat-Mukopolysaccharidose.", M Schr. Kinderhk., 119, 355-357, (1971).
- Sly W.S., Quinton B.A., McAlister W.H., Rimoin D.L., "Betaglucuronidase deficiency: Report of clinical, radiologic and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis.", J. Pediat., 82, 249-257, (1973).
- Spranger J.W., "Biochemical definition of the mucopolysaccharidoses.", Zschr. Kinderhk., 108, 17-31, (1970).
- Spranger J.W., "The systemic mucopolysaccharidoses.", Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde, Springer Verlag, Berlin, 166-265, (1972).
- Spranger J.W., Schuster W., Freitag F., "Chondroitin-4-sulfate mucopolysaccharidosis.", Helv. Paediat. Acta, 26, 387-396, (1971).
- Spranger J.W., Gilbert E.F., Tuffli G.A., Rossiter F.P., Opitz J.M., "Geleophysic dwarfism - A 'focal' mucopolysaccharidosis?", Lancet, ii, 97-98, (1971).
- Spranger J.W., Teller W., Rosenow W., Murken J., Eckert-Husemann E., "Die HS-Mukopolysaccharidose von Sanfilippo (Polydystrophie Oligophrenie).", Zschr. Kinderhk., 101, 71-84, (1967).
- Spranger J.W., Koch F., McKusick V.A., Natzschka J., Wiedemann H.-R., Zellweger H., "Mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy's disease).", Helv. Paediat. Acta, 25, 337-362, (1970).

- Stone A.L., Constantopoulos G., Sotsky S.M., Debakan A., "Optical rotatory dispersion of mucopolysaccharides. IV. Optical rotatory dispersion and circular dichroism of glycosaminoglycans and heparan sulfate fractions from the urine of patients with mucopolysaccharidosis (Hurler syndrome).", Biochim. Biophys. Acta, 222, 79-89, (1970).
- Taghavy A., Salsman K., Ledeen R., "An abnormal ganglioside pattern from a gargoyle brain.", Fed. Proc., 23, 218, (1964).
- Taketomi T., Yamakawa T., "Glycolipids of the brain in gargoylism.", Japan. J. Exptl. Med., 37, 11-21, (1967).
- Taysi K., Kistenmacher M.L., Punnett H.H., Mellman W.J., "Limitations of metachromasia as a diagnostic aid in pediatrics.", New England J. Med., 281, 1108-1111, (1969).
- Thompson G.R., Nelson N.A., Grobdney S.L., "A new mucopolysaccharidosis with increased urinary excretion of chondroitin sulfate A.", Arthritis Rheumat., 11, 516, (1968).
- VanHoof F., Hers H.G., "L'ultrastructure des cellules hépatiques dans la maladie de Hurler (gargoylisme).", Compt. Rend. Acad. Sci., 259, 1281-1283, (1964).
- Von Figura K., Kresse H., "The Sanfilippo B corrective factor: A N-acetyl- α -D-glucosaminidase.", Biochem. Biophys. Res. Com., 48, 262-269, (1972).
- Wallace B.J., Kaplan D., Adachi M., Schneck L., Volk B.W., "Mucopolysaccharidosis type III.", Arch. Pathol., 82, 462-473, (1966).
- Wherret J.R., "Analysis of glycolipids in the Hurler syndrome.", Pathol. europ., 3, 431-439, (1968).
- Wiesmann U., Neufeld E.F., "Scheie and Hurler syndromes: Apparent identity of the biochemical defect.", Science, 169, 72-74, (1970).

- Winchester P., Grossman H., Wan Ngo Lim, Danes B.S., "A new acid mucopolysaccharidosis with skeletal deformities simulating rheumatoid arthritis.", Am. J. Roentgenol., 106, 121-128, (1969).
- Wolfe H.J., "Techniques for the histochemical localization of extremely water soluble acid mucopolysaccharides.", J. Histochem. Cytochem., 12, 217-218, (1964).
- Young G.F., Wolfe H.J., Blennerhassett J.B., "Mental subnormality in Hurler-Hunter syndrome (gargoylism): A suggested biochemical cause.", Develop. Med. Child Neurol., 8, 37-44, (1966).
- Zelson J., Debakan A.S., "Biological behaviour of lymphocytes in Hunter-Hurler's disease.", Arch. Neurol., 20, 358-361, (1969).

TABLEAU 1 : PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES DIVERS TYPES DE MUCOPOLYSACCHARIDOSES

Type	Niveau clinique	Niveau génétique	Niveau biochimique secondaire	Niveau biochimique primaire	Comportement en culture mixte
<u>Hurler</u> Mucopolysaccharidose type I	déformations du squelette, face gargoyle, viscéromégalie, nanisme, cornée trouble, retard mental, mort avant la puberté	4 H S S S C H H C C H E C S C H C S	excrétion urinaire et accumulation intratissulaire d'héparan sulfate (+) et dermatan sulfate (+++)	absence de α -L-iduronidase	constitue un groupe correcteur
<u>Scheie</u> Mucopolysaccharidose type V	articulations raides, face grossière, régurgitation aortique, taille normale, cornée trouble, développement intellectuel normal, survie adulte		excrétion urinaire de dermatan sulfate, parfois d'héparan sulfate		
<u>Sanfilippo</u> Mucopolysaccharidose type III	déformations bénignes du squelette, viscéromégalie modérée, aspect corporel plus ou moins normal, taille normale, cornée claire, retard mental prononcé, survie au delà de la puberté		excrétion urinaire et accumulation intratissulaire d'héparan sulfate exclusivement	absence d'héparan sulfate sulfatase	constitue un groupe correcteur = type A
<u>Morquio</u> Mucopolysaccharidose type IV	déformations spécifiques graves du squelette, défaut des valvules aortiques, dents anormales, nanisme, cornée parfois trouble, développement intellectuel normal, survie adulte		excrétion urinaire et accumulation intratissulaire de kératane sulfate, éventuellement de chondroïtine-sulf.	absence de N-acétyl- α -D-glucosaminidase	constitue un groupe correcteur = type B
<u>Maroteaux-Lamy</u> Mucopolysaccharidose type VI	forme grave: déformations du squelette nanisme, cornée trouble, développement intellectuel normal, survie adulte forme bénigne: évolution plus lente		excrétion urinaire de dermatan sulfate	inconnu	le phénotype ne s'exprime pas in vitro: l'incorporation de sulfate est normale
<u>Hunter</u> Mucopolysaccharidose type II	forme grave: déformations du squelette face grossière, viscéromégalie, désordre cardio-vasculaire, surdité, nanisme, cornée claire, retard mental forme bénigne: défauts moins prononcés développement intellectuel normal	lié au sexe récessif	excrétion urinaire et accumulation intratissulaire de dermatan sulfate	inconnu	constitue un groupe correcteur

TABLEAU 2 : CLASSIFICATION ET STRUCTURE DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

Classe chimique	Nom	Unité disaccharidique répétitive	Séquence de liaison polysaccharide et protéine	Acide aminé de liaison
Polycarboxylates	Acide hyaluronique	glcUA $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$ glcNAc $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$	liaison à protéine pas encore prouvée	
	Chondroïtine	glcUA $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$ galNAc $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$		
Polysulfate	Kératan sulfate	gal-6-SO ₄ $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$ glcNAc-6-SO ₄ $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$	cornée: aucune	asn, gln
Polycarboxy-sulfates	Héparan sulfate	glcUA(ou idUA) $\xrightarrow{\alpha_{1,4}}$ $\rightarrow$ glcNAc(ou glcNSO ₄)-6-SO ₄ $\xrightarrow{\alpha_{1,4}}$	tissu conjonctif: galNAc	ser, thr
	Dermatan sulfate	idUA(ou glcUA) $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$ galNAc-4-SO ₄ $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$	glcUA $\xrightarrow{1,3}$ gal $\xrightarrow{1,3}$ gal $\xrightarrow{1,4}$ xyl $\rightarrow$ prot.	ser
	Chondroïtine-4-sulfate	glcUA $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$ galNAc-4-SO ₄ $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$		
	Chondroïtine-6-sulfate	glcUA $\xrightarrow{\beta_{1,3}}$ galNAc-6-SO ₄ $\xrightarrow{\beta_{1,4}}$		

Abréviations: glcUA : acide glucuronique glcNSO₄ : N-sulfate-glucosamine thr : thréonine
idUA : acide iduronique gal : galactose asn : asparagine
glcNAc : N-acétyl-glucosamine xyl : xylose gln : glutamine
galNAc : N-acétyl-galactosamine

TABEAU 3 : RELATIONS THEORIQUES ENTRE L'ACCUMULATION DE MUCOPOLYSACCHARIDES SPECIFIQUES ET DE LEURS PRECURSEURS

Mucopolysaccharide accumulé	Précurseur accumulé			
	Sulfate	Glucosamine	Galactosamine	Galactose
Acide hyaluronique	-	+	-	-
Chondroïtine	-	-	+	-
Chondroïtine-4(6)-sulfate	+	-	+	-
Chondroïtine-4(6)-sulfate avec séquence de liaison	+	-	+	+
Kératan sulfate	+	+	-	+
Kératan sulfate avec séquence de liaison	+	+	+	+
Héparan sulfate	+	+	-	-
Héparan sulfate avec séquence de liaison	+	+	-	+
Dermatan sulfate	+	-	+	-
Dermatan sulfate avec séquence de liaison	+	-	+	+

TABLEAU 4 : ORIGINE ET CARACTERISTIQUES DES LIGNEES CELLULAIRES MUTANTES UTILISEES

Diagnostic clinique	Désignation	Sexe	Origine de la culture ou du patient	Contrôle biochimique du phénotype 1)
HURLER	G.C.	mâle	Dr. S. Rampini	Hurler
HUNTER	H.P. 2)	mâle	Dr. P. Maroteaux	Hunter
	D.S.	mâle	Dr. S. Rampini	Hunter
	O.B.	mâle	Dr. S. Rampini	Hunter
SANFILIPPO	B.K. 3)	femelle	notre laboratoire	Sanfilippo type A
	R.K. 3)	mâle	notre laboratoire	Sanfilippo type A
	L.T.	femelle	Prof. P. Ferrier	Sanfilippo type A
	G.E.	femelle	Dr. K. Baerlocher	Sanfilippo type B
MAROTEAUX-LAMY	S.P. 2)	?	Dr. P. Maroteaux	Sanfilippo type B
	M. 2)	mâle	Dr. P. Maroteaux	Maroteaux - Lamy

- 1) effectué par le docteur U. Wiesmann, à l'aide de la technique des cultures mixtes (Neufeld et Cantz, 1971).
- 2) ces cultures nous ont été envoyées sous forme de lignées déjà établies; les autres ont été développées dans notre laboratoire à partir de biopsies cutanées. Elles présentent toutes une morphologie fibroblastique typique.
- 3) frère et soeur.

TABLEAU 5 : PRESENCE OU ABSENCE DES DIFFERENTS PRECURSEURS NON MARQUES DES MUCOPOLYSACCHARIDES DANS LES MILIEUX DE "PULSE" (EBM) ET DE "CHASE" (EBM ET PBS) SELON L'ETAPE DE MARQUAGE ET LE PRECURSEUR RADIOACTIF UTILISE

Marquage désiré	Etape	Précurseur radioactif 1)	Précurseur non radioactif 2)				
			Na ₂ SO ₄	D-glucosamine.HCl	D-galactosamine.HCl	D-galactose	D-glucuronate de Na
sulfate	pulse chase	Na ₂ ³⁵ SO ₄ -	- +	+ +		+ +	+ +
glucosamine	pulse chase	D-glucosamine-[6- ³ H] (N) • HCl -	+ +	- +		+ +	+ +
galactosamine	pulse chase	D-galactosamine-[1- ¹⁴ C] (N) • HCl -	- -	- -		- -	- -
galactose	pulse chase	D-galactose-[³ H] (G) -	+ +	+ +		- +	+ +
Glucose	pulse chase	D-glucose-[6- ³ H] (N) -	+ +	+ +		+ +	+ +

+ = présent dans le milieu ; - = absent du milieu

1) NEW ENGLAND NUCLEAR CHEMICALS

2) SIGMA (meilleure qualité disponible) pour les sucres, FLUKA (puriss.) pour le Na₂SO₄

TABLEAU 6 : ETUDE DE L'INCORPORATION DU SULFATE DANS DIVERSES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Lignées	Résultats standards	Sans extraction	Sans "chase"	Sans "chase" et sans extraction	"Chase" dans PBS
Normale 5	2.200 ± 200	1.800 ± 300	7.300 ± 1.900	6.800 ± 400	1.900
G.C.	9.500 ± 100	15.900 ± 2.700	29.300 ± 10.800	-----	10.800
H.P.	18.000 ± 1.700	16.500 ± 1.800	-----	-----	-----
D.S.	14.600 ± 700	14.200 ± 2.500	20.800 ± 10.500	22.500 ± 500	-----
O.B.	22.300 ± 5.000	23.600 ± 3.200	40.400 ± 10.100	-----	16.600
B.K.	3.600 ± 500	5.400 ± 400	-----	-----	-----
R.K.	3.000 ± 400	4.700 ± 200	5.800	9.500 ± 1.400	-----
L.T.	5.000 ± 1.000	12.000 ± 2.800	14.400 ± 4.500	-----	7.600
G.E.	3.100 ± 200	2.800 ± 700	-----	-----	-----
S.P.	2.900 ± 400	3.300 ± 300	-----	-----	-----
M.	11.400 ± 500	12.000 ± 500	16.400	11.700 ± 300	-----
Résultats en cpm/mg prot					
G.C.	443 ± 82	702 ± 134	275 ± 55	-----	850
H.P.	827 ± 100	785 ± 85	-----	-----	-----
D.S.	785 ± 57	703 ± 76	140	265 ± 25	-----
O.B.	1.125 ± 238	1.198 ± 160	360 ± 30	-----	920
B.K.	117 ± 18	120 ± 30	-----	-----	-----
R.K.	83 ± 29	95 ± 15	-----	58 ± 39	-----
L.T.	226 ± 74	505 ± 125	73 ± 27	-----	300
G.E.	90 ± 33	60 ± 10	-----	-----	-----
S.P.	54 ± 24	70 ± 10	-----	-----	-----
M.	540 ± 85	490 ± 4	-----	87 ± 23	-----
Résultats en % de différence					

Lignées	Résultats standards	Sans extraction	Sans "chase"	Sans "chase" et sans extraction	"Chase" dans EBM	
normale 1	7.400 ± 700	12.800 ± 1.100	-----	-----	-----	Résultats en cpm/mg prot.
normale 2	5.100 ± 500	8.900 ± 1.100	-----	-----	-----	
normale 3	10.200	17.400 ± 6.100	22.500 ± 7.700	49.400 ± 26.100	18.200	
normale 4	7.000 ± 1.000	11.500 ± 1.000	-----	-----	-----	
normale 5	5.000 ± 500	14.900 ± 3.600	25.500 ± 10.600	49.900 ± 2.900	27.600	
normale 6	8.400 ± 400	17.600 ± 2.600	-----	-----	-----	
G.C.	13.200 ± 900	22.100 ± 1.800	-----	-----	31.600	Résultats en % de différence
H.P.	8.100 ± 1.200	13.000 ± 700	-----	-----	-----	
D.S.	7.700 ± 600	11.600 ± 800	-----	36.600 ± 8.000	-----	
O.B.	9.900 ± 1.400	21.100 ± 4.300	17.100	31.700 ± 19.100	28.400	
B.K.	11.300 ± 800	15.600 ± 100	-----	-----	-----	
R.K.	7.600 ± 800	12.700 ± 1.800	-----	40.000	-----	
L.T.	9.700 ± 1.100	17.700 ± 2.900	-----	-----	-----	
G.E.	6.300 ± 1.400	10.600 ± 1.800	-----	-----	-----	
S.P.	5.600 ± 700	12.700 ± 4.500	-----	-----	-----	
M.	9.900 ± 1.500	17.300 ± 2.100	-----	46.500	-----	
G.C.	98 ± 1	39 ± 14	-----	-----	31	Résultats en % de différence
H.P.	20 ± 9	10 ± 4	-----	-----	-----	
D.S.	10 ± 3	- 5 ± 6	-----	- 2 ± 22	-----	
O.B.	35 ± 15	25 ± 12	2	- 21	18	
B.K.	68 ± 7	33 ± 3	-----	-----	-----	
R.K.	14 ± 5	7 ± 13	-----	- 20	-----	
L.T.	39 ± 7	12 ± 8	-----	-----	-----	
G.E.	- 6 ± 4	- 10 ± 13	-----	-----	-----	
S.P.	- 16 ± 4	7 ± 36	-----	-----	-----	
M.	48 ± 11	47 ± 15	-----	- 8	-----	

TABLEAU 8 : ETUDE DE L'INCORPORATION DU GLUCOSE DANS DIVERSES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Résultats en cpm/mg prot.		Résultats en % de différence			
Lignées	Résultats standards	Sans extraction	Sans "chase"	Sans "chase" et sans extraction	"Chase" dans EBM
normale 1	3.200 + 400	5.600 + 500	-----	-----	-----
normale 2	2.700 + 100	5.800 + 800	-----	-----	-----
normale 3	3.600	4.400	5.700 + 1.000	16.500 + 400	10.800
normale 4	3.100 + 200	5.000 + 300	-----	-----	-----
normale 5	3.100 + 200	5.000 + 300	7.200 + 0	11.200 + 4.200	8.300
normale 6	4.300 + 100	6.600 + 500	-----	-----	-----
G.C.	3.300 + 200	11.100 + 2.200	10.500 + 3.100	-----	13.800
H.P.	2.900 + 100	5.200 + 200	-----	-----	-----
D.S.	3.200 + 400	4.800 + 200	-----	11.300 + 1.600	-----
O.B.	3.100 + 100	11.400 + 2.700	9.500	10.700 + 0	9.100
B.K.	2.200 + 100	3.900 + 400	-----	-----	-----
L.T.	3.400 + 300	13.300 + 3.200	-----	5.800	-----
G.E.	2.700 + 100	4.700 + 600	-----	-----	-----
M.	2.400	3.700	-----	-----	-----
G.C.	1 + 7	7 + 3	22	-----	49
H.P.	- 10 + 2	- 8 + 2	-----	-----	-----
D.S.	- 7 + 8	- 9 + 9	-----	- 19 + 1	-----
O.B.	- 6 + 3	17 + 8	40	- 18 + 8	- 1
B.K.	- 31 + 2	- 33 + 7	-----	-----	-----
L.T.	2 + 9	24 + 16	-----	- 51	-----
G.E.	- 16 + 4	- 15 + 12	-----	-----	-----
M.	- 30	- 36	-----	-----	-----

TABLEAU 9 : ETUDE DE L'INCORPORATION DU GALACTOSE DANS DIVERSES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Lignées	Résultats standards	Sans extraction	Sans "chase"	Sans "chase" et sans extraction	"Chase" dans EMB
normale 1	25.700 ± 1.800	51.300 ± 200	-----	-----	----
normale 2	13.000 ± 800	39.000 ± 500	-----	-----	----
normale 4	10.000 ± 800	29.500 ± 3.500	-----	-----	----
normale 5	8.000 ± 500	153.900 ± 11.300	120.000	137.500	180.000
normale 6	22.700 ± 700	51.500 ± 11.500	-----	-----	----
G.C.	18.800 ± 700	107.400 ± 43.700	279.000	-----	343.000
H.P.	17.000	35.500	-----	-----	----
D.S.	20.800 ± 1.200	52.500	-----	198.000	----
O.B.	12.500	107.000 ± 26.300	132.100 ± 3.500	-----	170.000
B.K.	17.300 ± 1.200	47.500	-----	-----	----
R.K.	15.700 ± 700	44.800 ± 3.700	-----	193.000	----
L.T.	13.200 ± 800	73.600 ± 19.000	-----	-----	----
G.E.	8.500 ± 3.100	13.000 ± 2.000	-----	-----	----
S.P.	19.700 ± 1.800	39.500 ± 500	-----	-----	----
M.	54.000	96.000	-----	341.000	----
G.C.	11 ± 7	- 12 ± 8	83	-----	57
H.P.	3	- 20	-----	-----	----
D.S.	26 ± 7	20	-----	8	----
O.B.	- 24	11 ± 19	15 ± 3	-----	- 25
B.K.	5 ± 7	8	-----	-----	----
R.K.	- 4 ± 4	13 ± 3	-----	5	----
L.T.	19 ± 4	- 23 ± 6	-----	-----	----
G.E.	- 48 ± 20	67 ± 8	-----	-----	----
S.P.	20 ± 10	1 ± 12	-----	-----	----
M.	277	118	-----	85	----

Résultats en cpm/mg prot.

Résultats en % de différence

TABLEAU 10 : RESUME DES RESULTATS D'ACCUMULATION

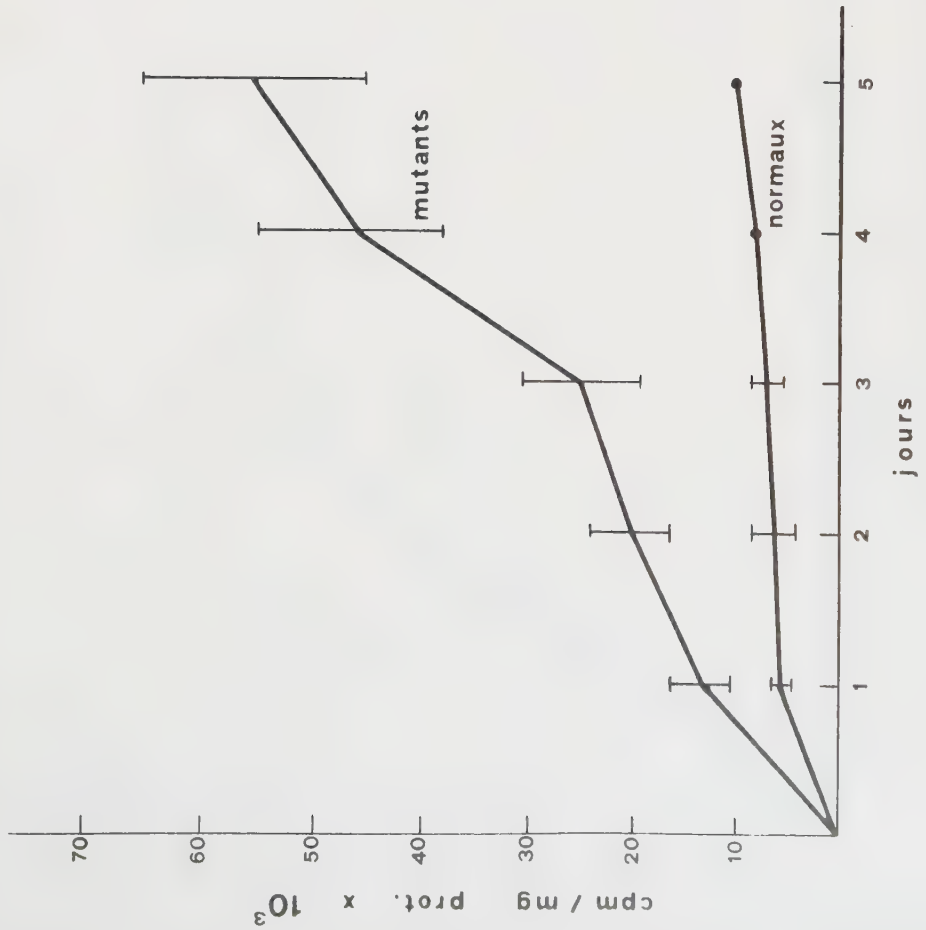
Phénotypes	Hurler	H u n t e r			Sanfilippo			Maroteaux-Lamy			
		G.C.	H.P.	D.S.	O.B.	B.K.	R.K.		L.T.	G.E.	S.P.
Lignées	G.C.										
Sulfate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosamine	+	<u>+</u>	<u>+</u>	+	+	+	<u>+</u>	+	-	-	+
Galactosamine	?	+	+	+	-	?	-	-	?	+	+
Glucose	-	-	-	-	-	-	?	<u>+</u>	-	?	-
Galactose	-	-	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	+

+ = accumulation significative ; + = accumulation peu significative
 - = pas d'accumulation significative ; ? = pas testé

Le caractère significatif d'une accumulation est jugé sur la base des résultats quantitatifs présentés dans les figures 1-9 et des critères définis sous Matériel et Techniques (Analyse des résultats).

Figure 1-A : Cinétique d'incorporation du $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$.

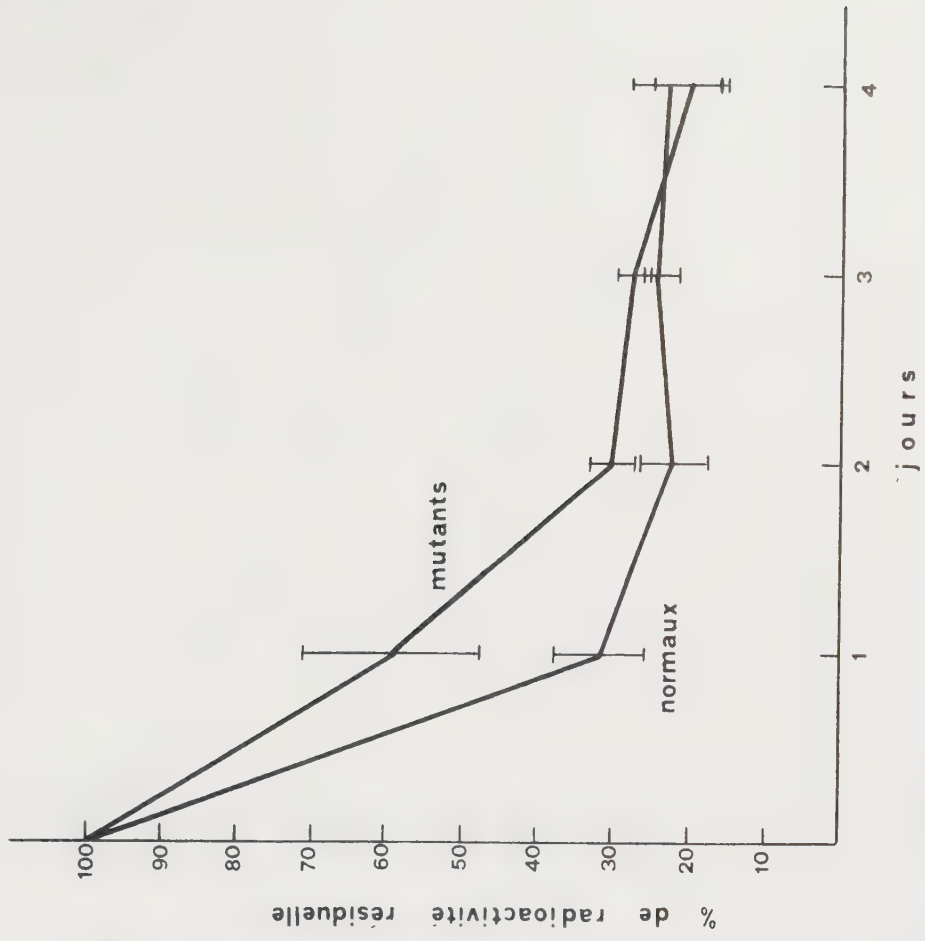
Méthode de marquage standard sans "chase" avec durée de "pulse" variable.



Valeurs moyennes des lignées suivantes:
normaux: normales 1, 7 et 8
mutants: G.C., D.S., O.B., L.T., M.

Figure 1-B : Cinétique de "chase" du $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$.

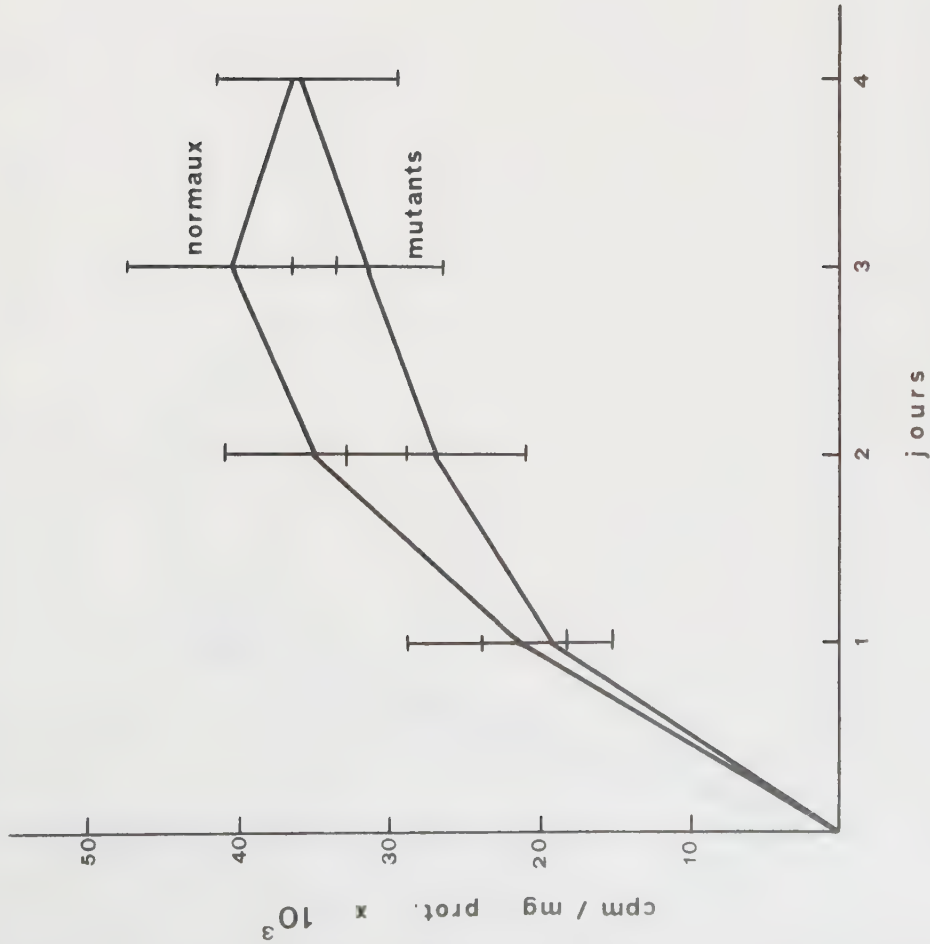
Méthode de marquage standard avec durée de "chase" variable en milieu EBM.



Valeurs moyennes des lignées suivantes:
normaux: normales 5 et 7
mutants: G.C., O.B., L.T.

Figure 2-A : Cinétique d'incorporation de la glucosamine- $[6-^3\text{H}]$.

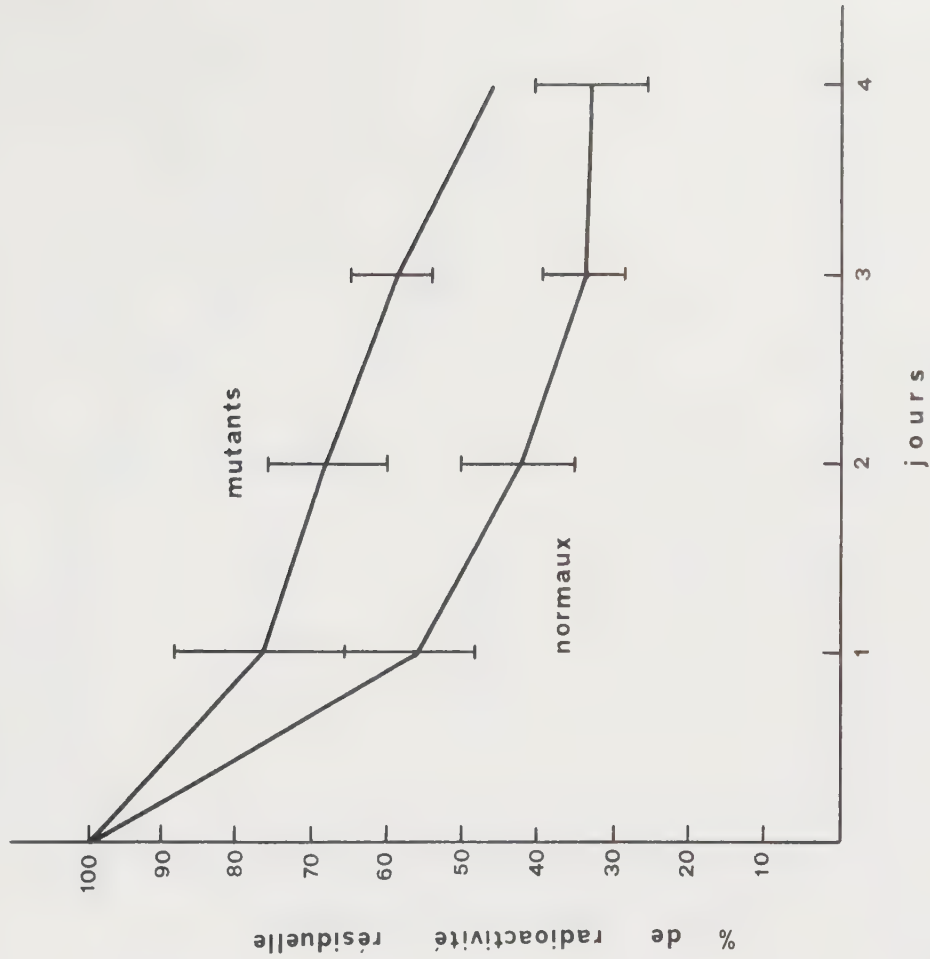
Méthode de marquage standard sans "chase" avec durée de "pulse" variable.



Valeurs moyennes des lignées suivantes:
normaux: normales 3, 5 et 7
mutants: G.C., O.S., O.B.

Figure 2-B : Cinétique de "chase" de la glucosamine- $[6-^3\text{H}]$.

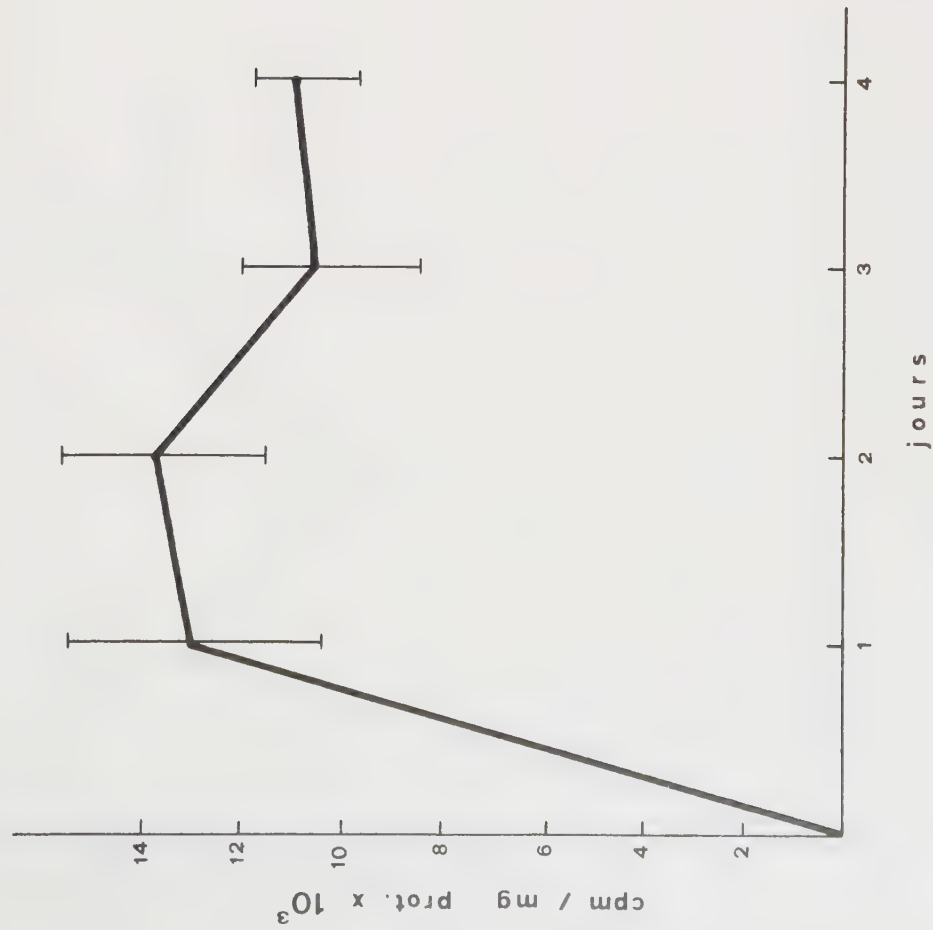
Méthode de marquage standard avec durée de "chase" variable en milieu EBM.



Valeurs moyennes des lignées suivantes:
normaux: normales 3, 5 et 7
mutants: G.C. et O.S.

Figure 3-A : Cinétique d'incorporation du glucose- $[^3\text{H}]$.

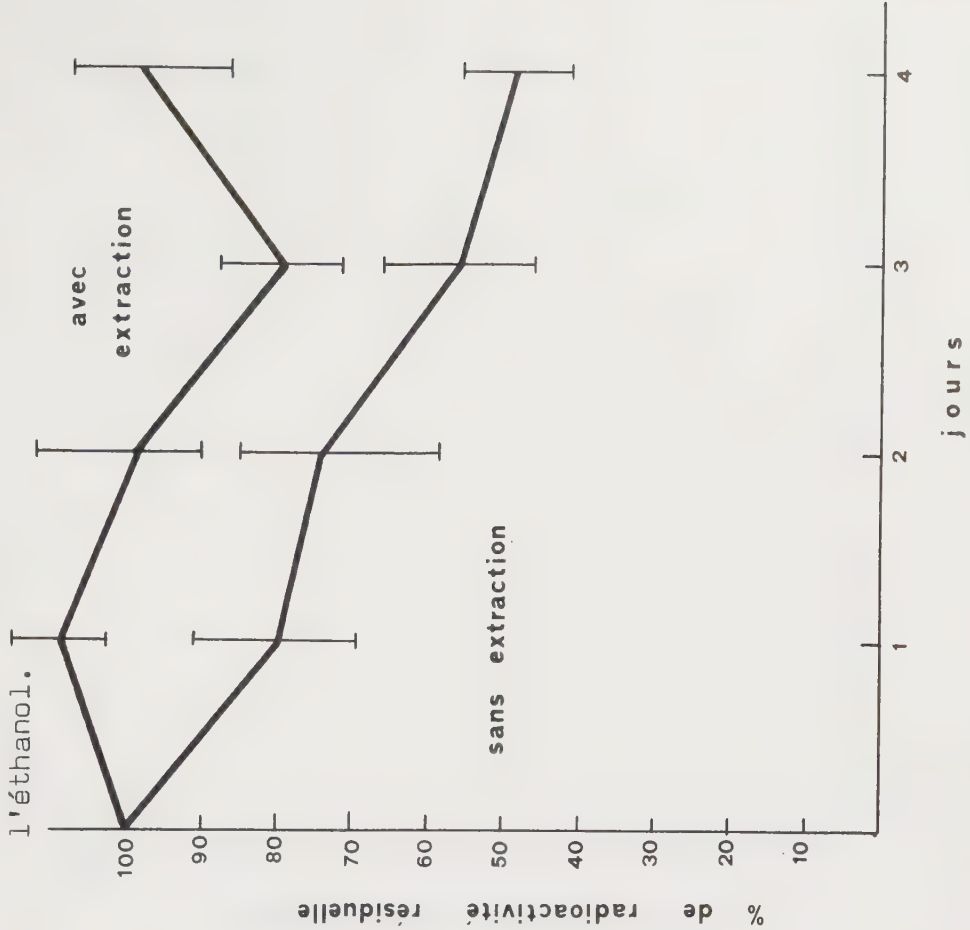
Méthode de marquage standard sans "chase" avec durée de "pulse" variable.



Valeurs moyennes des lignées suivantes: normales 3, 5 et 7, G.C., D.S. et 0.B.

Figure 3-B : Cinétique de "chase" du glucose- $[^3\text{H}]$.

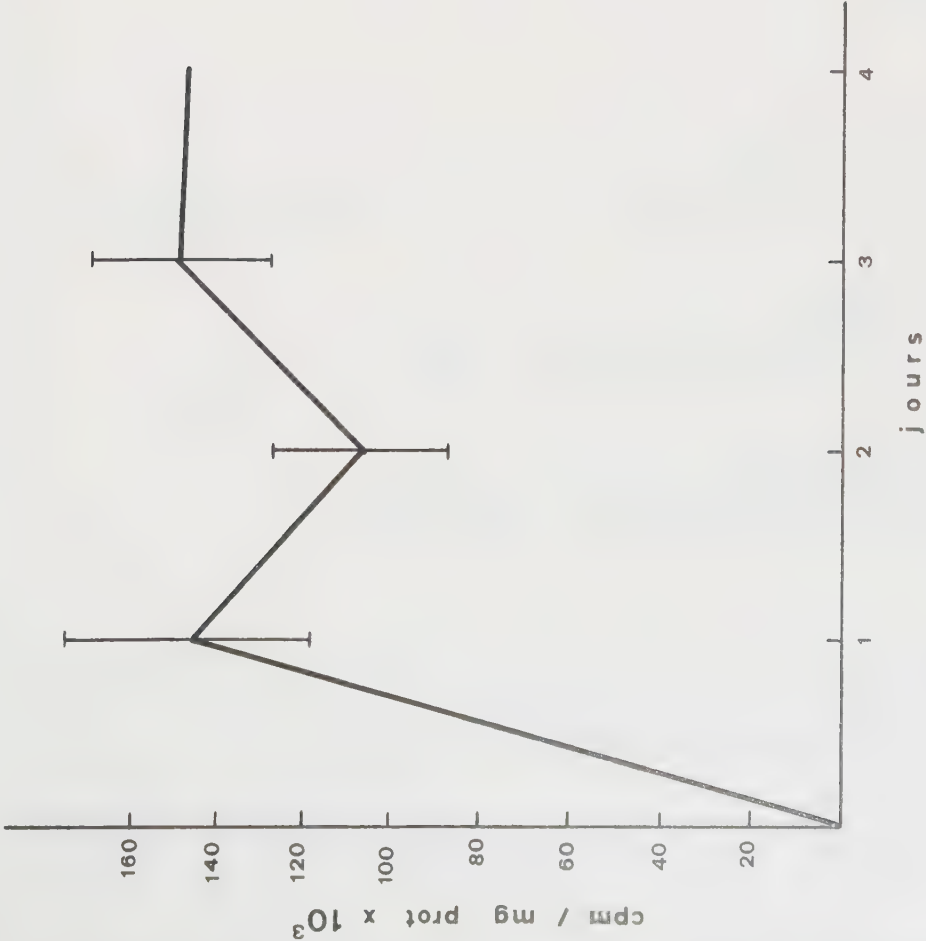
Méthode de marquage standard avec durée de "chase" variable en milieu EBM, avec ou sans extraction à l'éthanol.



Valeurs moyennes des lignées suivantes: normales 3, 5 et 7, G.C., D.S., 0.B. et L.T.

Figure 4-A : Cinétique d'incorporation du galactose- $[^3\text{H}]$.

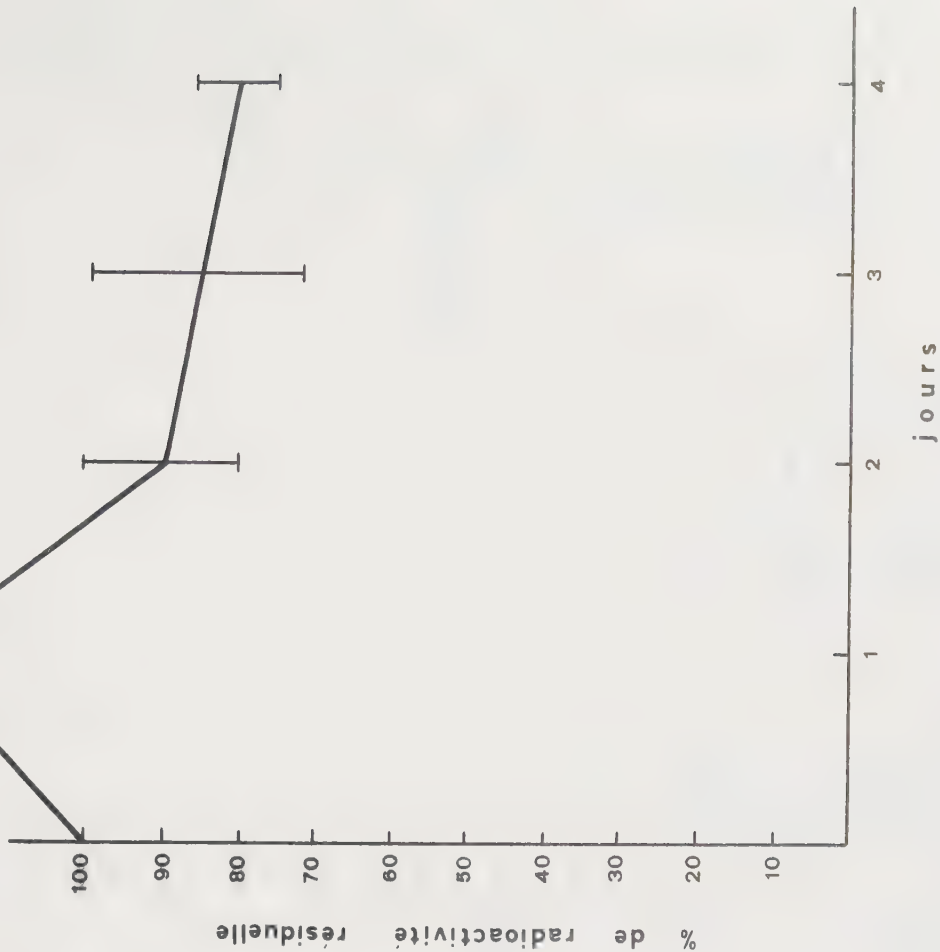
Méthode de marquage standard sans "chase" avec durée de "pulse" variable.



Valeurs moyennes des lignées suivantes: normales 3 et 5, G.C. et O.B.

Figure 4-B : Cinétique de "chase" du galactose- $[^3\text{H}]$.

Méthode de marquage standard avec durée de "chase" variable en milieu EBM.



Valeurs moyennes des lignées suivantes: normales 5 et 7, G.C. et O.B.

FIGURE 5 : % DE DIFFERENCE MOYENS ENTRE CELLULES MUTANTES ET NORMALES POUR LE MARQUAGE AVEC LE $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

Ces résultats sont calculés à partir des données du comptage par scintillation (colonnes de gauche) et de l'autoradiographie (colonnes de droite). Les écarts-type moyens du zéro sont de 5 % pour le comptage par scintillation et de 7 % pour l'autoradiographie. Ils sont trop petits pour être portés sur le graphique.

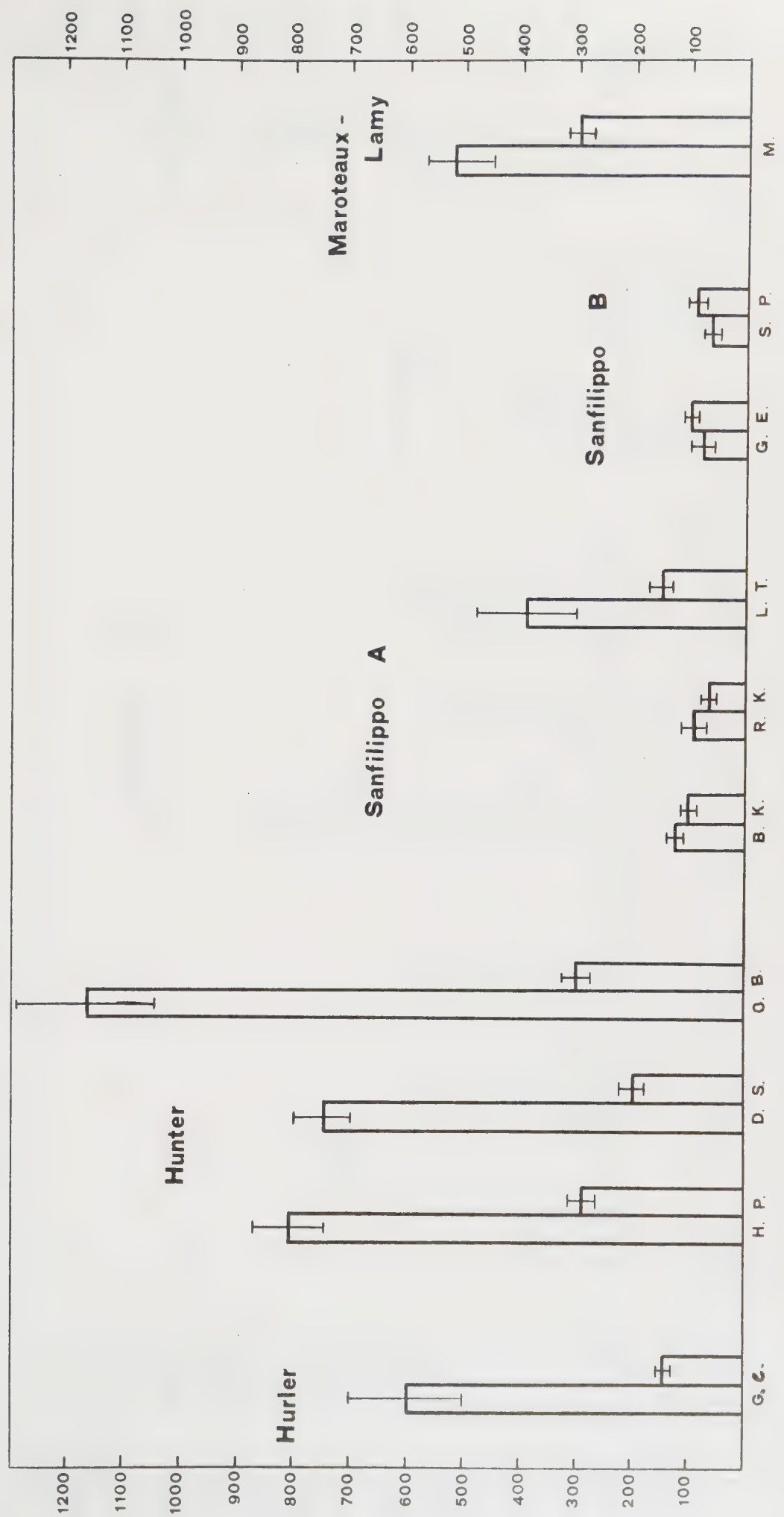


FIGURE 6 : % DE DIFFERENCE MOYENS ENTRE CELLULES MUTANTES ET NORMALES POUR LE MARQUAGE AVEC LA GLUCOSAMINE- $[6-^3H]$

Ces résultats sont calculés à partir des données du comptage par scintillation (colonnes de gauche) et de l'autoradiographie (colonnes de droite). $s_{\bar{x}}$ sont les écarts-type moyens du zéro pour le comptage par scintillation (à gauche) et l'autoradiographie (à droite).

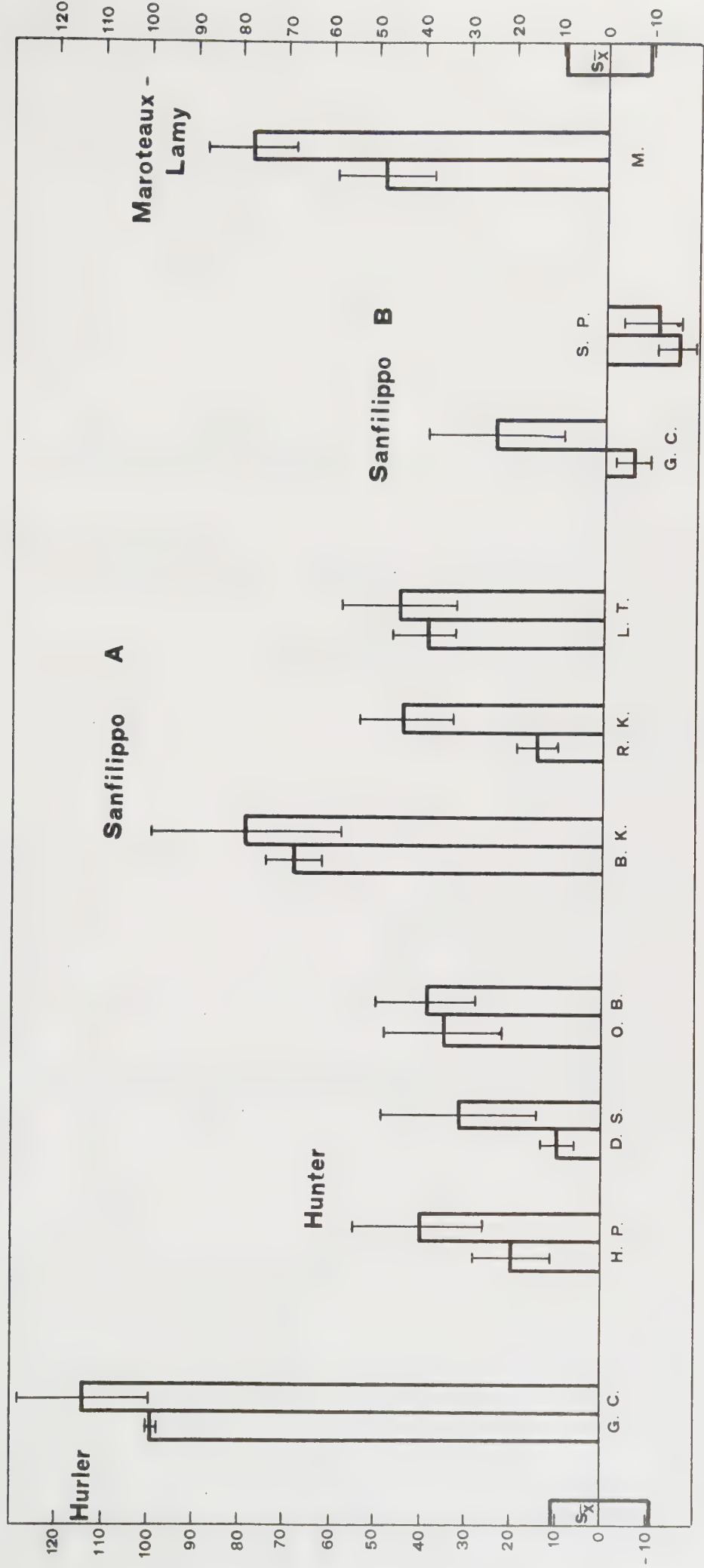


FIGURE 7 : % DE DIFFERENCE MOYENS ENTRE CELLULES MUTANTES ET NORMALES POUR LE MARQUAGE AVEC LA GALACTOSAMINE- $[1-^{14}C]$

Résultats fondés sur le comptage par scintillation. $s_{\bar{x}}$ désigne l'écart-type moyen du zéro.

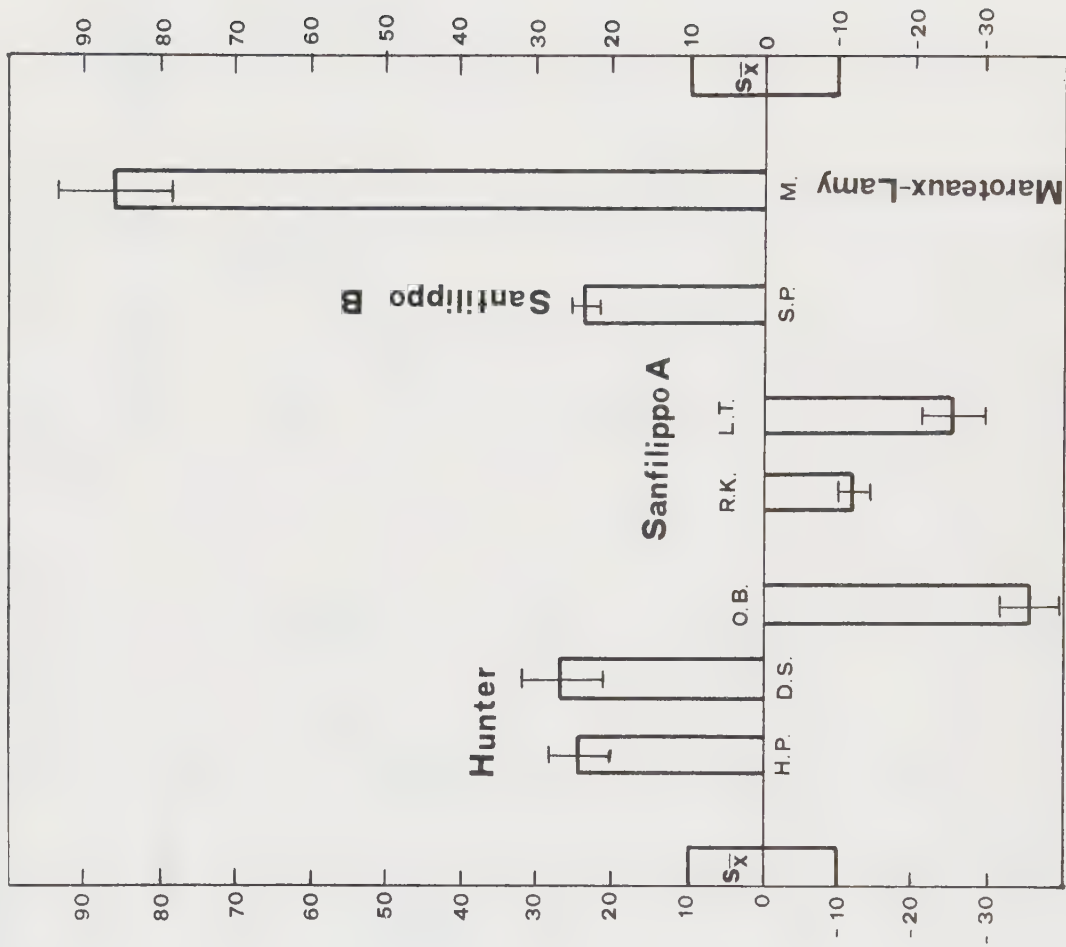


FIGURE 8 : % DE DIFFERENCE MOYENS ENTRE CELLULES MUTANTES ET NORMALES POUR LE MARQUAGE AVEC LE GLUCOSE- $[6-^3H]$

Ces résultats sont calculés à partir des données du comptage par scintillation (colonnes de gauche) et de l'autoradiographie (colonnes de droite). $s_{\bar{x}}$ sont les écarts-type moyens du zéro pour le comptage par scintillation (à gauche) et l'autoradiographie (à droite).

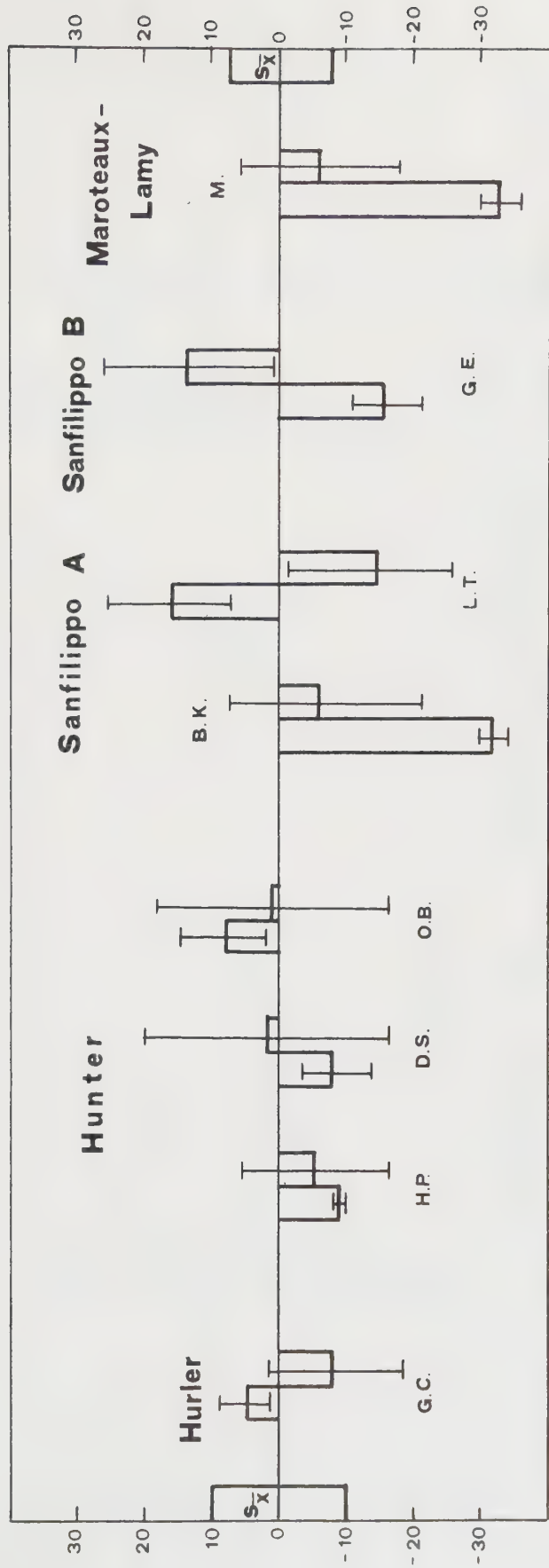


FIGURE 9 : % DE DIFFERENCE MOYENS ENTRE CELLULES MUTANTES ET NORMALES POUR LE MARQUAGE AVEC LE GALACTOSE- ^{3}H

Résultats fondés sur le comptage par scintillation. $s_{\bar{x}}$ désigne l'écart-type moyen du zéro.

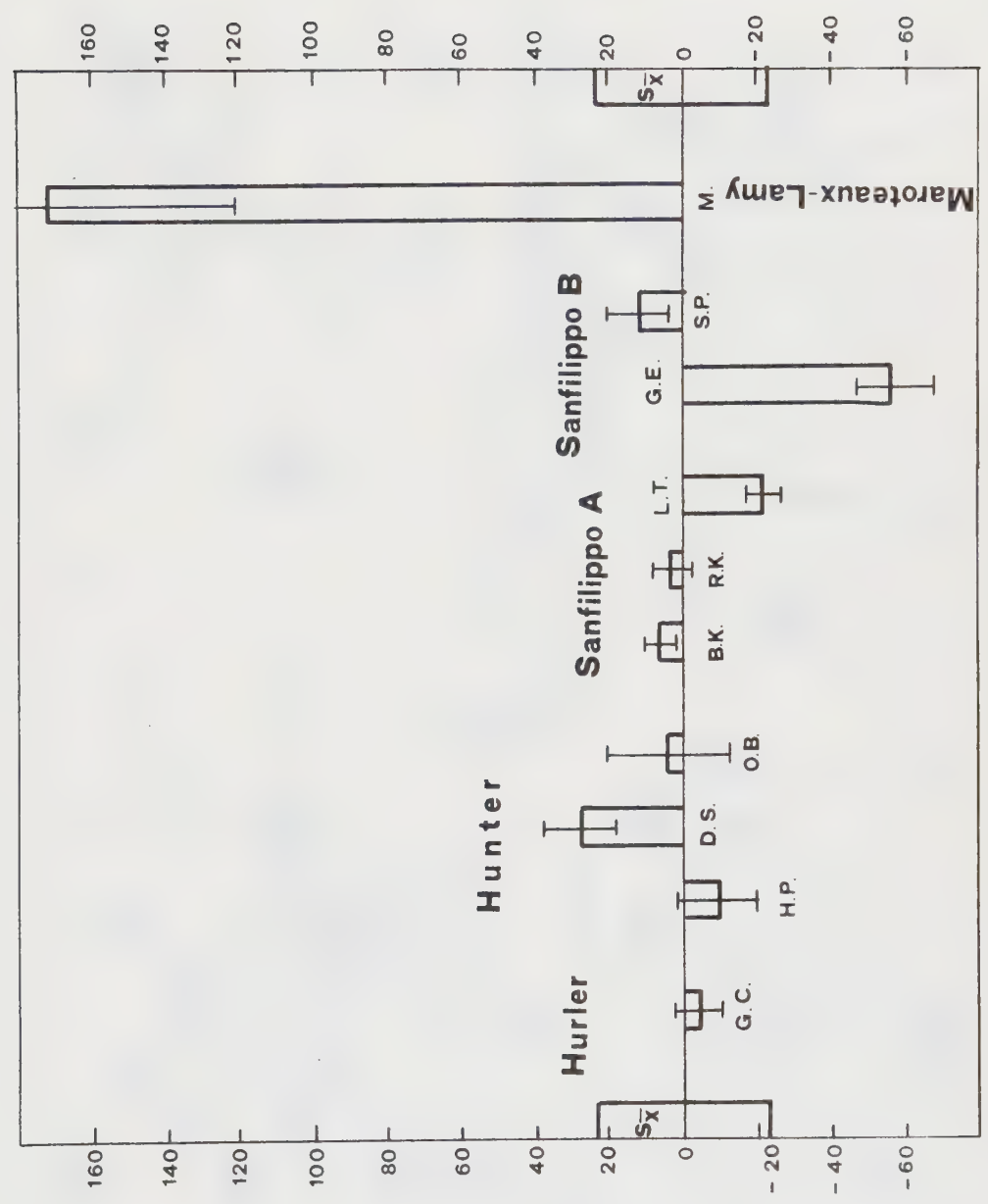


PLANCHE 1: ANALYSE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DU $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$

A: normale 5 (x300) ; B: B.K.(Sanfilippo A) (x360) ; C: G.C.(Hurler) (x360) ; D: O.B.(Hunter) (x300)

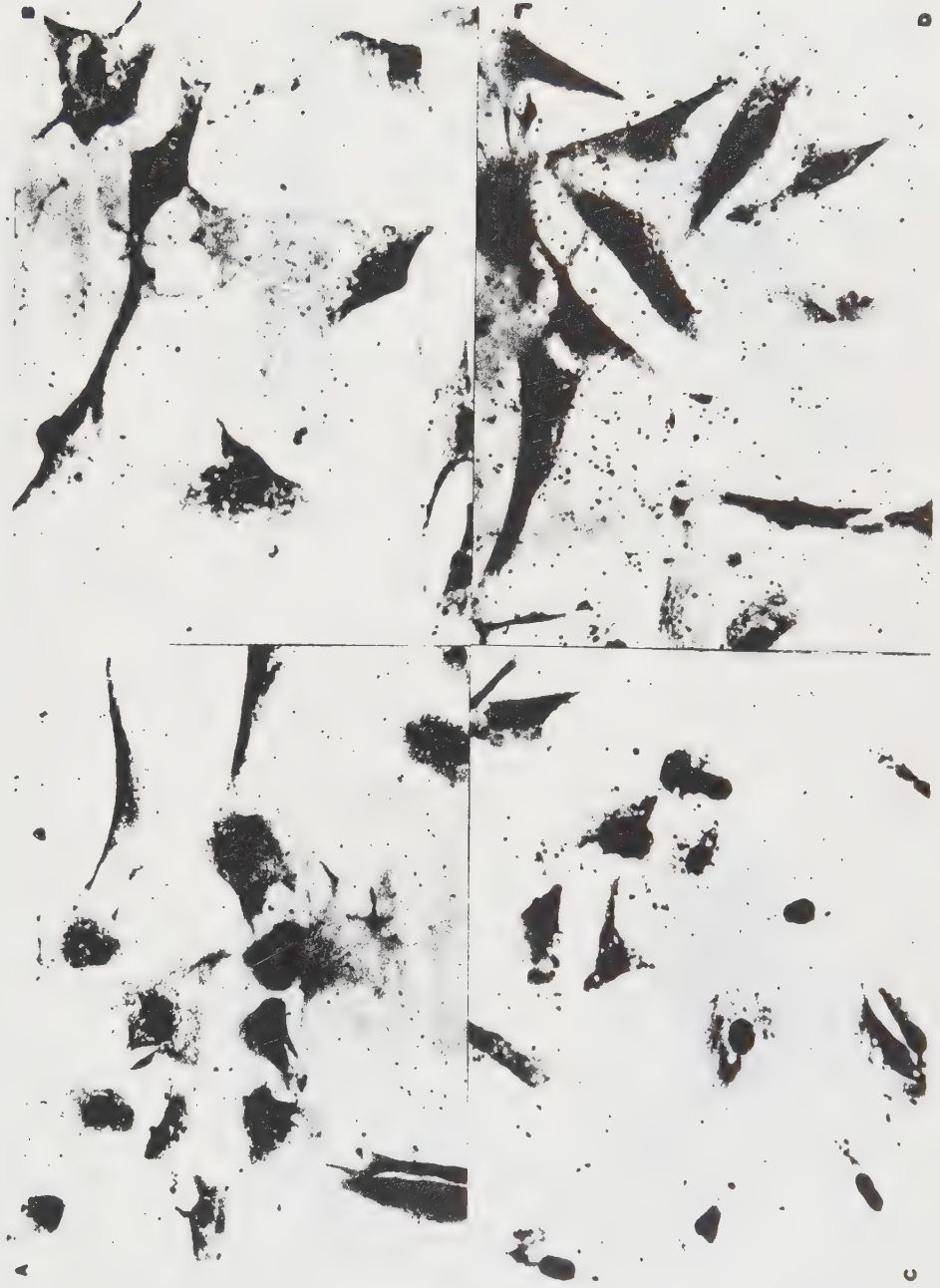


PLANCHE 2 : REPARTITION INTRACELLULAIRE DU MARQUAGE AUTORADIOGRAPHIQUE DANS QUELQUES CELLULES MUTANTES

Précurseur utilisé : glucosamine- $[6-3H]$

A. B et D. B.K. (Sanfilippo A) (x600, x770 et x960) ; C. G.C. (Hurler) (x960)



PLANCHE 3 : HETEROGENEITE DU MARQUAGE AVEC LE GALACTOSE- ^{3}H] ET ABSENCE DE CHEMOGRAPHIE

A: normale 1 (x 600) ; B: normale 9 (x 300) ; C: cellules déficientes en galactose-kinase (x 360)

